



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y
TECNOLOGÍA

Determinación de los grupos filogenéticos de
***Escherichia coli* aisladas en muestras**
ambientales y humanas de Panamá

Mauren Acevedo

Tesis presentada como uno
de los requisitos para optar
al grado de Maestro en
Microbiología Ambiental

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2017



Título de la Tesis:

"Determinación de los Grupos Filogenéticos de Escherichia coli aisladas en muestras ambientales y humanas de Panamá"

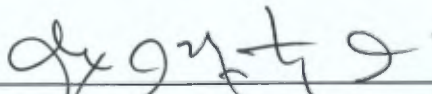
TESIS

Sometida para optar al título de Maestría en Microbiología Ambiental

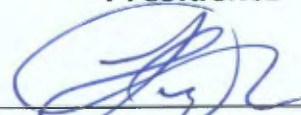
Vicerrectoría de Investigación y Postgrado

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

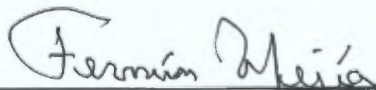
APROBADO POR:



Doctor Alex Martínez
Presidente



Prof. Humberto Cornejo
Miembro



Prof. Fermín Mejía
Miembro

REFRENDADO POR:

**REPRESENTANTE DE LA VICERRECTORÍA
DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

FECHA:

ALEX O MARTINEZ TORRES Profesor Especial del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Panama

CERTIFICA QUE MAUREN CECILIA ACEVEDO ROMERO

Ha realizado bajo su direccion el trabajo de investigacion correspondiente a su Tesis de Maestria con el titulo DETERMINACION DE LOS GRUPOS FILOGENETICOS DE *Escherichia coli* AISLADAS EN MUESTRAS AMBIENTALES Y HUMANAS DE PANAMA

Revisado este trabajo autorizan su presentacion para ser juzgado y para que así conste a los efectos oportunos firman el presente certificado en Panama el ____ de _____ de _____

AGRADECIMIENTO

Primero que todo doy gracias Dios por ser mi sustento fuerza y el motor que impulsa mis sueños y permitirme alcanzar una nueva meta en mi vida Al profesor Dr Alex O Martinez Torres por su apoyo incondicional tiempo y motivacion en la asesoria de este trabajo a los profesores Mgter Fermin Mejia Mgter Humberto Cornejo y Sara Ahumada por su valiosa asesoria en la redaccion de este documento

A la profesora Maria Araque de la Universidad de los Andes en Venezuela por el envio desinteresado de las cepas control para este estudio

A la Dra Carmenza Spadafora por proporcionarno la cepa de *E coli* K12

A todas las personas familiares y amigos que de una u otra forma brindaron apoyo moral o espiritual para culminar esta etapa

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico primeramente a Dios porque el merece toda la gloria a mis padres Abel Acevedo y Leticia de Acevedo porque lo que soy hoy lo debo a ellos mi padre porque no dejaba pasar ninguna oportunidad para motivarme a terminar este trabajo

A mi esposo Yovani Oses por creer en mi y apoyar mis metas porque siempre estuvo dispuesto a quedarse hasta altas horas de la noche en el laboratorio aun en medio del cansancio apoyandome a terminar y todo este tiempo ha sido mi respaldo

A mis asesores por la paciencia y demas familiares y amigos que se alegran con este proyecto finalizado no tengo palabras para darles gracias ha sido largo el viaje pero al fin llegue

INDICE

INDICE DE FIGURAS	vii
INDICE DE CUADROS	viii
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
INTRODUCCION	11
REVISION DE LITERATURA	14
1 Importancia de los estudios Filogeneticos	15
1 1 Generalidades de <i>E coli</i>	16
2 Resistencia a los antibioticos de <i>E coli</i>	16
3 Diversidad Evolutiva de <i>E coli</i>	18
4 Descripcion de los mecanismos e invasion de las cepas patogenas de <i>E coli</i>	20
4 1 <i>E coli</i> Enteropatogenica	20
4 2 <i>E coli</i> Enterotoxigenica	20
4 3 <i>E coli</i> Enteroinvasiva	21
4 4 <i>E coli</i> Enteroagregativa	22
4 5 <i>E coli</i> Verotoxigenica	23
5 Descripcion de Virulencia de <i>E coli</i>	24
5 1 Factor de Adhesion	25
5 1 1 Sistema de Adquisicion de hierro	25
6 Plasmidos Colv	26
7 Mecanismos de defensa del huesped frente a la accion del patogeno	27
7 1 Integridad anatomica y funcional de las vias urinarias	27
7 2 Diuresis con vaciado completo	28
7 3 Cualidades de la Orina	28
8 Mecanismos locales de defensa del urotelio	28
9 Nuevas Metodologias para analisis moleculares	28
9 1 Analisis de microorganismos por RFLPs	29
9 2 Ribotipificacion	29
9 3 RAPD	29
9 4 Metagenomica o genomica ambiental	30
9 5 PCR en tiempo real	30
9 6 Electroforesis Capilar	31
9 7 Electroforesis de Campo Pulsado	31
9 8 Cuantificacion de ADN en geles de agarosa	32
9 9 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	32
9 10 Reaccion en Cadena de la polimerasa	33
9 11 PCR Multiple	34
9 12 Determinacion de los grupos filogeneticos de los aislados de <i>E coli</i>	35

9 13	Cepas de <i>E coli</i> ampliamente estudiadas y de importancia en el analisis filogenetico	35
10	Objetivos	40
11	MATERIALES Y METODOS	41
11 1	Puntos de Muestreo	42
11 2	Preparacion de medios de cultivo y crecimiento bacteriano	43
11 3	Procesamiento molecular de las cepas	43
11 4	Extraccion de los acidos nucleicos	43
11 5	Preparacion de los geles	44
11 6	Condiciones de amplificacion para la determinacion de los grupos filogeneticos de las muestras	44
12	RESULTADOS	47
12 1	Identificacion de cepas potencialmente patogenas en la ciudad del niño	53
12 2	Descripcion de las cepas de <i>E coli</i> obtenidas en el punto de muestreo de Escobal	54
12 3	Descripcion de las cepas de <i>E coli</i> obtenidas en la comunidad del Arado	54
12 4	Prevalencia de genes para la identificacion de filogrupos por tipo de muestra	54
12 5	Distribucion de genes relacionados con la localidad de muestreo	55
13	DISCUSION	56
14	CONCLUSIONES	66
15	RECOMENDACIONES	68
16	BIBLIOGRAFIA	70

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema patogenico de cepas de <i>E coli diarrenogenica</i>	20
Figura 2	Esquema de sistema de captacion de hierro mediado por sideroforos en <i>E coli</i> K12	26
Figura 3	Arbol de clasificacion dicotomica para determinar el grupo filogenetico de aislados de <i>E coli</i> usando los resultados de amplificacionpor PCR de los genes <i>ChuA</i> y <i>YjaA</i> y del fragmento de ADN TspE4C2	35
Figura 4	Porcentaje de filogrupo de <i>E coli</i> distribuidos en los distintos puntos de muestreo en base al numero total de cepas	50
Figura 5	Relacion entre el numero de cepas potencialmente patogenas por tipo de muestra y sitio de muestreo	52
Figura 6	Porcentaje de cepas patogenas por localidad en base al numero de muestras estudiadas en cada sitio	53

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Secuencia de los indicadores utilizados para la amplificación y determinación de los grupos filogenéticos de aislados de <i>E. coli</i>	45
Cuadro 2	Concentraciones de los reactivos utilizados para la mezcla de PCR	46
Cuadro 3	Presencia o ausencia de los genes <i>ChuaA</i> <i>YjaA</i> <i>TspE4C2</i> que se obtuvieron en las diferentes muestras de los sitios de colecta	48
Cuadro 4	Prevalencia de cepas potencialmente patógenas relacionadas con cada filogrupo	51
Cuadro 5	Distribución de los genes para el análisis filogenético por localidad de muestreo	54
Cuadro 6	Prevalencia de genes para la identificación de filogrupos por tipo de muestra	55

RESUMEN

La *Escherichia coli* (*E. coli*) es un comensal flora normal del intestino y es una bacteria Gram negativa de la familia de las *Enterobacteriaceae* que causar infecciones entericas y extraintestinales tanto en humanos como en animales. Las causantes de infecciones extraintestinales derivan principalmente del grupo B2 y en menor proporcion del grupo D los cuales poseen gran numero de determinantes de virulencia que promueven funciones patogenicas mientras que los comensales derivan de los grupos A y B1 que poseen pocos determinantes de virulencia. El objetivo de esta investigacion es determinar a que filogrupo pertenecen las cepas de *E. coli* aisladas de muestras ambientales y humanas. Se analizaron 140 muestras ambientales y humanas colectadas en el corregimiento de El Arado y la Ciudad del Niño distrito de La Chorrera provincia de Panama Oeste y del corregimiento de Escobal provincia de Colon. Todas las muestras fueron procesadas en LAMEXA y LAMA donde la extraccion de ADN cromosomico se realizo por metodos convencionales y se confirmo por electroforesis en gel de agarosa. La deteccion de los filogrupos de *E. coli* se baso en la presencia o ausencia del gen *chuA* y *yjaA* que identifica el genoma de *E. coli* K 12 (funcion desconocida) y un fragmento del gen *TspE4 C2* que codifica para una esterasa lipasa. Este estudio mostro que de 140 muestras analizadas 16 muestras se ubicaron en el filogrupo B2, nueve en el filogrupo D, una en el filogrupo B1 y 116 en el filogrupo A1. El 11.43% (16/140) de las muestras pertenecen al filogrupo B2, el 5.00% (7/140) al filogrupo D y el 83.57% (117/140) a los filogrupos B1 y A1 los cuales son consideradas cepas comensales. Estos datos indican que cepas potencialmente patogenas estan circulando en estas comunidades, situacion que podria desencadenar serios problemas de salud publica.

Abstract

The *Escherichia coli* (*E. coli*) is a bacterium Gram negative commensal and normal flora of intestine and is a member of the enterobacteriaceae family that causes extra intestinal enteric infections in humans and animals. The causes of the extra intestinal infections derive mainly from group B2 and in less proportion from D group which possess great number of determinants of virulence that promotes pathogenic functions. While the commensals derive from the A and B1 group which possess few determinants of virulence. The purpose of this research is to determine what phylogroup belongs to the strains of *E. coli* isolated from environmental samples and humans. One hundred forty environmental and human samples were analyzed in the village of El Arado and La Ciudad del Niño district of La Chorrera province of Panama Oeste and also in the village of Escobal province of Colon. All the samples were processed in LAMEXA and LAMA where the extraction of the chromosomal DNA was made through conventional methods and it was confirmed by electrophoresis in agarose gel. The detection of the *E. coli* phylogroups was based on the presence or absence of *chuA* and *yjaA* genes that identify the *E. coli* K12 genome (unknown functions) and a fragment of the *TspE4 C2* gene that encodes to a lipase esterase enzyme. This study showed that of one hundred forty analyzed samples sixteen samples were located in B2 phylogroup, nine in D phylogroup, one in B1 phylogroup and 116 in A1 phylogroup. The 11.43% (16/140) of the samples belong to B2 phylogroup and 5.00% (7/140) to D phylogroup and the 83.57% (117/140) to the B1 and A1 phylogroups which are considered commensal strains. This information shows that the potentially pathogenic strains are circulating in these communities, a situation that might trigger serious problems of public health.

INTRODUCCIÓN

El estudio del medio ambiente debe ser considerado un tema estratégico y de prioridad en la investigación científica ya que la mayoría de enfermedades que se atienden a nivel hospitalario causado por virus y bacterias proceden del ambiente (Prado 2008)

La diarrea continua siendo un importante problema de salud en el mundo especialmente en los países en vías de desarrollo (1) Entre las bacterias asociadas a diarrea infantil están los diferentes patotipos de las *E coli* diarrenogénicas (DEC) Estas bacterias colonizan el intestino del ser humano y pueden transmitirse directamente de persona a persona (Ochoa 2011)

Por esta razón las investigaciones de aislamiento y caracterización de aislados ambientales de *E coli* procedentes de ecosistemas acuáticos suelo y muestras de origen animal y humano aportan información novedosa y necesaria para el conocimiento de esta temática en nuestro país

La *E coli* está presente en diferentes nichos ecológicos y se ha descrito como microorganismos comensales o patógenos en personas y animales En el tracto digestivo las cepas comensales se localizan principalmente en el colon específicamente en la mucosa epitelial (Tenaillon 2010)

La *E coli* ha sido comúnmente utilizada como indicador o modelo en estudios sobre los niveles de resistencia a antimicrobianos en poblaciones bacterianas que conforman la microbiota intestinal en animales domésticos (Sunde 2001)

La transferencia horizontal parece tener un papel crucial en la adaptación bacteriana a nichos ecológicos específicos y en la diseminación y en la persistencia de la resistencia a antimicrobianos entre miembros de la familia *Enterobacteriaceae* como lo es la *E coli* (Barnet 2004)

A pesar de que la *E coli* es la bacteria mas estudiada en cuanto a su fisiologia y genetica curiosamente los mecanismos patogenicos que operan en las enfermedades producidas por este agente no han sido estudiadas con atencion (Lopez 2011)

Las tecnicas de biologia molecular para la deteccion rapida y directa de acidos nucleicos de los diferentes microorganismos son muy utiles en el diagnostico de las enfermedades infecciosas de esta manera los nuevos metodos de analisis a nivel genetico han aumentado la posibilidad de diferenciar las cepas bacterianas y han permitido llevar a cabo estudios epidemiologicos moleculares (Matar 2000)

Este trabajo permite abrir un espacio de interes dirigido a investigaciones a nivel molecular enfocados en el aislamiento de cepas ambientales permitiendo recopilar datos precisos del comportamiento y distribucion de cepas en nuestro pais brindando a las entidades encargadas de velar por la salud publica poner en accion medidas preventivas para la proliferacion de enfermedades zoonoticas

REVISIÓN DE LITERATURA

IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS FILOGENETICOS

Los cambios mas significativos que se han dado en el marco del avance de las ciencias biologicas en las ultimas dos decadas han surgido principalmente de la aplicacion de tecnicas moleculares del ADN para abordar una gran variedad de problemas que afectan directamente a nuestra calidad de vida en aspectos como la salud la alimentacion y medio ambiente que se aplica al desarrollo de nuevos farmacos productos y servicios en campos tan diversos como la medicina o la agricultura El enfoque molecular asociado con el filogenetico ha tenido un gran impacto en las clasificaciones biologicas el modo de interpretar procesos evolutivos y el estudio de las vias de dispersion de distintos organismos (filogeografia) (Avise 1994)

La genetica de poblaciones cuenta con diversas tecnicas que permiten estudiar la estructura y la historia evolutiva de las poblaciones mediante la obtencion de datos que luego son analizados estadisticamente y/o filogeneticamente (Avise 2000)

Las relacion entre especies o taxones de los organismos llamado filogenia proveen una descripcion de la biodiversidad dado que brindan informacion acerca de como se distribuye los caracteres estudiados en una poblacion (Moritz 1995) Se pueden reconstruir filogenias de individuos de una poblacion con el objeto de obtener informacion relevante sobre la dinamica historica de dicha poblacion o filogenias de especies o poblaciones que aportaran evidencias sobre como ha ocurrido la evolucion de un grupo (Harvey y Steers 1999)

El objetivo de la investigacion filogenetica es descubrir los productos de la filogenesis y su ordenacion o relacion en la secuencia de especiacion en el tiempo esto es llamado Sistemática Filogenética y su tarea es construir un sistema que contenga unicamente grupos monofileticos es decir representar todas las relaciones entre grupos hermanos (Revilla 2012)

GENERALIDADES DE *Escherichia coli*

La *E coli* es un bacilo con forma de baston que mide aproximadamente 2 µm de largo y 0.5 µm de diametro anaerobia facultativa y generalmente movil gracias a la presencia de flagelos peritricos No forma esporas (Garrity *et al* 2005)

La *E coli* es un comensal parte de la flora normal del intestino del ser humano y de animales de sangre caliente es una bacteria Gram negativa perteneciente a la Familia *Enterobacteriaceas* que puede causar infecciones entericas y extra intestinales tanto en humanos como en animales tales como cerdos conejos perros aves pollos entre otros (Sousa 2001) En algunos casos se desconoce si la especie normalmente sirve como reservorio o solamente es un portador temporal (Rovid *et al* 2011)

La gran plasticidad genomica de la *E coli* le confiere habilidades ecologicas extraordinarias La *E coli* puede adaptarse rapidamente a diferentes ambientes y es capaz de vivir como un organismo de vida libre o como comensal mutualista del colon en mamiferos y aves Adicionalmente en el interior de los organismos puede invadir otros nichos con exito y de esta manera llegar a ser un patogeno mortal muy competitivo (Sousa 2001)

Resistencia a los Antibiotico en *E coli*

La resistencia a los antibioticos es un fenomeno biologico natural debido a las mutaciones y a la gran capacidad de las bacterias de transferir horizontalmente su material genetico existiendo una clara correlacion entre el uso de antibioticos y la resistencia bacteriana (Mosquito 2011)

Esto constituye un problema a nivel mundial que supone mayor sufrimiento humano perdida en la productividad y mortalidad La relacion antibiotico bacteria se ve alterada por otros multiples factores como la farmacocinetica de la droga la dosis la duracion del tratamiento el tamaño de inculo bacteriano etc por lo que para optimizar el uso de estos farmacos se realizan supervisiones periodicas de la

resistencia como parte transcendental de la política de control de la resistencia antibiótica (Andersson 2010)

La vigilancia molecular se basa en la identificación de genes que codifican los mecanismos de resistencia en las bacterias y que representan el futuro de la vigilancia de resistencia antibiótica. Estos genes surgen ante el uso de un antibiótico específico; sin embargo, pueden generar también resistencia cruzada afectando otros antibióticos de la misma clase o con el mismo mecanismo de acción, incluso a compuestos de familias diferentes (Iañez 1998).

Así mismo, en numerosas ocasiones, genes de resistencia a diferentes antimicrobianos se encuentran asociados en una misma estructura genética (integrones), lo que da lugar al fenómeno de co-selección de resistencia (mantenimiento en la bacteria de genes capaces de conferir resistencia a un antimicrobiano mediante el uso de un agente antimicrobiano no emparentado) (Di Conza 2010). De esta manera, conocer el bagaje de genes de resistencia contribuye a tomar mejores políticas de uso antibiótico que intenten controlar la diseminación de estos genes (Di Conza 2010).

La resistencia para algunos antibióticos en *E. coli*, como las fluoroquinolonas, ampliamente utilizadas para el tratamiento de infecciones en el tracto urinario, ocurren por mutaciones cromosómicas (Abarca 2001).

Las mutaciones de resistencia de la *E. coli* caen en dos clases. En primer lugar, están las mutaciones en los genes que codifican para las enzimas blanco del antibiótico: ADN girasa y topoisomerasa IV. En segundo lugar, están las mutaciones que disminuyen la concentración del antibiótico dentro de la bacteria. En última categoría, se incluyen las mutaciones que causan la sobreexpresión de bomba de flujo, como por ejemplo el sistema de proteína AcrAB-TolC (Marchetti *et al.* 2011).

Además, cambios en los niveles relativos de expresión de porinas, específicamente la disminución de OmpF, se han relacionado a un incremento del nivel de resistencia a

las fluoroquinolonas por inhibición de la entrada del antibiótico a la célula bacteriana (Cohen *et al* 1988)

Diversidad Evolutiva de *E coli*

Existen diversos modelos que intentan explicar la evolución bacteriana donde se propone que los múltiples mecanismos de patogenicidad de los microorganismos son el producto de la adquisición de genes llamados de virulencia por medio de la transferencia horizontal. De esta manera podemos deducir según López (2011) que la variedad de clones patógenos de *E coli* son el resultado de la adquisición constante de diferentes factores de virulencia siendo los mismos codificados por genes presentes en plásmidos, islas de patogenicidad y en fagos que son elementos genéticos intercambiados con una alta frecuencia entre diferentes cepas de bacterias, proceso que se ha definido como transferencia horizontal de genes (Muniesa 2011).

La recombinación genética es el proceso mediante el cual los elementos genéticos contenidos en el genoma de diferentes individuos se combinan. Esto permite que el individuo origine alguna nueva función que pueda dar como resultado una adaptación a los cambios en el medio ambiente. Este es un evento evolutivo importante y las células tienen mecanismos específicos que aseguran que dicha recombinación se efectúe (Betancor *et al* 2008).

Dentro de las cepas patógenas se encuentran las causantes de diarreas, las cuales se han categorizado de acuerdo al efecto que causan en el hospedero, su interacción con la mucosa intestinal y la epidemiología asociada con la virulencia en un plásmido (Cortez 2002). Estos patotipos son *E coli* enteropatógena (EPEC), *E coli* enterohemorrágica (EHEC), *E coli* enteroinvasiva (EIEC), *E coli* enteroagregativa (EAaggEC), *E coli* enterotoxigénica (ETEC) y *E coli* adherente difusa (DAEC) (Nataro y Kaper 1998).

El sistema de clasificación antigénica propuesto por Kauffman en la actualidad se reconocen que los serotipos de *E coli* son combinaciones específicas del grupo O y

antígeno H Se conoce la existencia de unos 180 antígenos somáticos (O1 a O185) Los antígenos H son los antígenos flagelares de los que hay al menos 56 tipos El tipo H es importante para las cepas de *E coli* diarrenogénicas porque la mayoría de las cepas de ETEC pertenecen a serotipos específicos lo que facilita su identificación La determinación de estos antígenos se realiza por técnicas de aglutinación usando antisueros absorbidos para evitar las reacciones cruzadas Por tal razón la asociación entre serotipos específicos y la producción de virulencia determinada por un plásmido permanece incierta (AESAN 2012)

La serotipificación de *E coli* requiere de gran número de antisueros Como hay pocos laboratorios que la realizan se prefiere identificar las cepas mediante sus factores de virulencia empleando ensayos *in vitro* como por ejemplo ensayos de adherencia en células Hep 2 y ensayos de toxigenicidad en células En muchos países los serotipos más encontrados son O1 O2 y O78 (Dziva y Stevens 2008) Estos serogrupos también pueden ser recuperados de las heces reforzando la teoría de que el tracto intestinal puede ser un importante reservorio natural de *E coli* patógeno aviar (APEC) por sus siglas en inglés y que la enfermedad se produce gracias a los factores predisponentes También se pueden realizar ensayos *in vivo* como el asa ligada o la prueba de Sereny así como ensayos inmunológicos y pruebas de biología molecular para poner de manifiesto la presencia de fragmentos de genes involucrados en el mecanismo de patogenicidad y que sirvan de marcadores moleculares (Rodríguez 2002)

Las cepas patógenas de *E coli* pueden dar lugar a enfermedades tanto intestinales como extraintestinales ocasionando principalmente tres tipos de síntomas clínicos infecciones del tracto urinario (UTI) sepsis o meningitis neonatal y enfermedades entericas que en algunos casos pueden derivar en Síndrome Uremico Hemolítico (SUH) Las bacterias causantes de enfermedades entericas se adquieren por vía oral y eso hace que tengan gran interés desde el punto de vista de la seguridad alimentaria El mecanismo de infección básico que sigue esta bacteria es el de la gran mayoría de patógenos de las mucosas colonización de la mucosa evasión de las defensas del hospedador multiplicación y daño en el individuo (Nataro y Kaper 1998)

Descripción de los mecanismos e invasión de las cepas patógenas de *E. coli*

E. coli enteropatogénico (EPEC)

La clasificación de las cepas de EPEC comprende aquellas que causan la lesión de adhesión y borrado (*A/E-attaching and effacing*) de las microvellosidades de los enterocitos (Margall *et al.*, 1997) y que no producen verotoxinas (VT) (Levine *et al.*, 1987) ni poseen capacidad invasiva *in vivo* (López *et al.*, 2011) (Fig. 1).

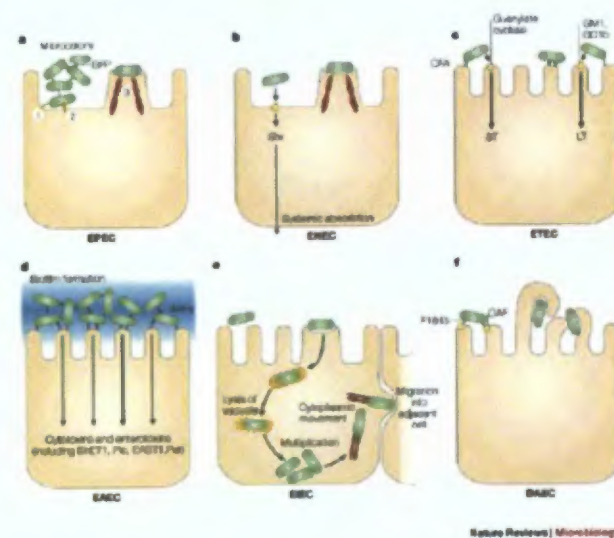


Figura 1. Esquema patogénico de cepas de *E. coli* diarreagénicas (Tomado de Kaper *et al.*, 2004).

La adhesión a células intestinales está relacionada con la expresión de la fimbria BFP (*Bundle Forming Pilus*), necesaria para la producción de diarrea. En el hombre se produce una diarrea líquida con mucosidad acompañada de vómitos y fiebre. Al igual de lo que sucede con otras *E. coli* diarrenogénicas, la transmisión de EPEC ocurre por vía fecal-oral a través de manos, agua y alimentos contaminados. La contaminación de los alimentos puede ocurrir durante el proceso de faena de los animales que son reservorios de la bacteria. Es frecuente en los países desarrollados y en los países en vía de desarrollo (Rodríguez G.2002).

En Argentina, la incidencia de diarreas infantiles es de 150/100.000 niños menores de cinco años y la EPEC es uno de los agentes más prevalentes (Margall *et al.*, 1997;

Nataro *et al* 1998) Los serotipos mas frecuentes entre las cepas EPEC tipicas son O55 H6 O55 H O86 H34 O111 H2 O111 H O114 H2 O119 H6 O119 H O127 H6 O142 H6 Dentro de las EPEC atipicas se ha descrito una amplia variedad de serotipos a nivel mundial entre los cuales predominan O33 H6 O51 H40 O51 H49 O111 H O119 H2 O127 H40 O132 H34 O145 H OR H y una gran proporcion de ONT (ausencia de reaccion con los antisueros empleados) Sin embargo un mismo serogrupo puede estar asociado a una cepa tipica o a una atipica (Alonso *et al* 2014)

Los rumiantes especialmente la especie bovina representan un importante reservorio de cepas de EPEC En pequeños rumiantes la mayoria de las cepas de EPEC se han aislado de corderos cabritos y en cerdos afectando tanto a los lechones recién nacidos como a los que estan en periodo de destete (Cortes 2007) Las cepas que causan diarreas en conejos tambien provocan lesiones de adhesión y borrado y pertenecen a un numero reducido de serotipos que son totalmente diferentes a los encontrados en los aislados humanos así como las adhesinas Las enteritis causadas por cepas de EPEC constituyen la principal causa de mortalidad y morbilidad en conejos destetados y lactantes en Europa (Cortes 2007) Tambien se han descrito cepas de EPEC causantes de diarrea en perros y al igual que en el caso anterior los serotipos de las cepas de EPEC presentes en perros son distintos a los encontrados en las cepas de EPEC humanas y de conejos (Beutin 1999 Blanco *et al* 2002)

***E coli* enterotoxigenica (ETEC)**

Junto con la EPEC son los patogenos responsables de la diarrea del viajero o de origen alimentario por alimentos importados muy frecuente en paises en via de desarrollo (Villa 2013) Se adhiere a la mucosa del intestino delgado no la invade y se produce la liberación de enterotoxinas (termolabil LT y termoestable ST) responsables del cuadro clinico En el hombre se produce una diarrea liquida profusa sin sangre ni material purulento y ausencia de fiebre (Margall *et al* 1997) Las fimbrias responsables de la adhesión de las ETEC son especificas del hospedador por ello las cepas causantes de diarrea en humanos son diferentes a las aisladas en animales Por ejemplo la fimbria K 88 se ha detectado en aislados de origen porcino K 99 en terneros y corderos y CFAI y CFaII en aislados humanos (Todar 2008) En animales

es muy frecuente que afecte a individuos¹ jóvenes y recién destetados ocasionando importantes pérdidas económicas en el ganado bovino ovino caprino y porcino (Blanco *et al* 1991 1993 1996) Es la primera causa de diarrea en rumiantes y la enfermedad mas importante en cuanto a mortalidad en neonatos La forma septicémica afecta a animales entre 2 5 días de edad cursando de modo sobreagudo con diarrea profusa síndrome febril intenso elevada mortalidad y sintomatología nerviosa En el ganado porcino es responsable de la diarrea neonatal en lechones y enfermedad del edema Esta última se debe a cepas que además de producir enterotoxinas sintetizan la verotoxina VT2v responsable de alteraciones neuronales También pueden provocar infecciones urinarias sistémicas y mastitis (Blanco *et al* 2006)

***E coli* enteroinvasiva (EIEC)**

El grupo de EIEC y *Shigella* spp se encuentran relacionadas genética y bioquímicamente Estos microorganismos poseen la misma capacidad de depender de plásmidos para evadir y multiplicarse en el interior de las células epiteliales del intestino es mucho mas frecuente que la disenteria Estructuralmente su secuencia de aminoácidos es idéntica a la *Shigella* spp pero no produce toxina Shiga (Eslava *et al* 1994 Rodríguez 2002)

Se asocia fundamentalmente con brotes de origen alimentario por alimentos importados (Margall *et al* 1997) siendo responsables de la diarrea del viajero El mecanismo de patogenicidad de la EIEC es la invasión del epitelio del colon sin producción de toxinas LT y ST dando lugar a una diarrea disenteriforme acuosa que se manifiesta con sangre y mucosidad en heces acompañado de fiebre y dolor abdominal (Todar 2008) En algunos casos solo se produce diarrea siendo difícil diferenciarla de la producida por ETEC (Rodríguez 2002)

***E coli* enteroagregativo (EAEC)**

Los estudios realizados sobre la capacidad adherente de la *E coli* a células heterohaploides (HEp 2) muestran que además de la adherencia localizada existen

otros dos mecanismos uno llamado difuso que se produce cuando las bacterias se unen al citoplasma celular y otro agregativo que se forma cuando las bacterias se acumulan en forma de empalizada tanto en la superficie celular como en el vidrio de la preparacion (Arias *et al* 2007)

Estudios recientes han definido algunas características de estas cepas como es el fenómeno de la auto agregación que está determinado por un plásmido de 55 a 65 Megadaltons (MDa) que codifica para una fimbria de adherencia un lipopolisacárido uniforme y una nueva enterotoxina termoestable (TE) denominada toxina enterotoxigena estable (TEAE) Se han detectado algunas cepas que elaboran una segunda toxina termolábil antígenicamente relacionada con la hemolisina de *E coli* la cual puede causar necrosis de las micro vellosidades acortamiento de las vellosidades intestinales e infiltración mononuclear de la submucosa (Arias *et al* 2004)

La infección por EAEC se ha asociado con la diarrea infantil en países en vías de desarrollo puede causar brotes o casos aislados de diarrea persistente (Rodríguez 2002) La EAEC son *E coli* que presentan un tipo de fimbrias que les permiten adherirse de un modo agregativo a la mucosa del intestino grueso y delgado produciendo un aumento de la secreción de mucus que atrapa a las bacterias y que permite su autoaglutinación en una fina película en el epitelio intestinal Posteriormente estas bacterias liberan la enterotoxina termoestable ST responsable del cuadro clínico y de las lesiones histopatológicas a nivel intestinal Se trata de una diarrea persistente acuosa mucosa e incluso sanguinolenta de más de 14 días de duración (Blanco *et al* 2002)

***E coli* verotoxigenico o enterohemorrágica (VTEC o EHEC)**

De todos los serotipos de VTEC la *E coli* O157 H7 es la que produce patología con más frecuencia Los principales factores de virulencia de este microorganismo son la producción de verotoxinas VT1 y VT2 la producción de fimbrias plasmídicas (CDV 419) y la síntesis de una proteína íntima codificada por el gen *eae* La VT1 es casi idéntica a la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1 El reservorio más importante de la *E*

coli O157 H7 es el ganado bovino aunque parece que estas cepas no producen patologia en los animales (Crespo 1998) Los rumiantes pueden actuar como portadores asintomaticos de cepas de VTEC potencialmente patogenas para el hombre (Blanco *et al* 2002 Cortes 2007) Se han aislado VTEC en otras especies animales como en ganado porcino gatos y perros sin embargo la frecuencia de aislamiento es de 7.5, 13.8 y 4.8% respectivamente que ha sido inferior a la obtenida en rumiantes (Beutin *et al* 1993)

La transmision es por alimentos y de persona a persona El alimento asociado con mas frecuencia a brotes es la carne bovina (especialmente hamburguesas) aunque se ha encontrado en gran variedad de vehiculos de transmision como la carne de pavo salami leche yogur mayonesa ensaladas vegetales crudos zumos de frutas y agua contaminadas con este microorganismo (Crespo 1998)

Descripcion de virulencia de *E coli*

La virulencia de un microorganismo determina en gran medida su potencial para establecer una infeccion Al hablar de las cepas de *E coli* no todas poseen la misma capacidad para infectar el aparato urinario Solo las cepas con determinado grado de virulencia son capaces de producir afectaciones en el tracto urinario mientras que en pacientes con anormalidades anatomicas o funcionales del mismo cepas sin determinantes de virulencia son capaces de causar una infeccion (Bingen *et al* 1994)

La mayoría de las cepas de *E coli* se les conoce su virulencia determinando su filogrupo Utilizando diferentes procedimientos como la electroforesis de enzimas multilocus y la ribotipificacion por medio de los cuales se han identificado cuatro grandes grupos filogeneticos A, B1, B2 y D en *E coli* (Selander *et al* 1986 Bingen *et al* 1994)

Las diferencias entre las *E coli* patogenas y comensales se correlacionan con sus antecedentes filogeneticos Los causantes de infecciones extraintestinales (ExPEC) derivan principalmente del grupo B2 y en menor proporcion del grupo D y

ademas poseen gran numero de determinantes de virulencia que promueven funciones patogenicas (adherencia mecanismos de evasion del sistema inmune del hospedero adquisicion de hierro invasion celular) mientras que los comensales derivan de los grupos A y B1 y poseen pocos determinantes de virulencia (Moreno *et al* 2006)

Factor de Adhesion

Se hizo un trabajo en Brasil donde se demostro la presencia de factores de adhesion presentes en plasmidos de 60 MDa que codifica FimA csgA y tsh asi como factores de resistencia a antibioticos que al ser mutados por un transposon perdio la capacidad de adhesion a celulas Hep 2 y traqueales Ademas esto indica que el gen tsh esta presente en otros plasmidos intercambiables que no sean Colv y que el uso de antibioticos pueda seleccionar estas cepas (Stehling 2003)

Sistema de Adquisicion de hierro

El sistema de adquisicion de hierro parece ser el principal factor de virulencia de *E coli* Existen varios operones de mecanismos de adquisicion de hierro (aerobactina yersiniabactina *sit e iro*) esto se presenta con alta frecuencia en APEC asociada a grandes plasmidos y menos frecuentes en cepas comensales (Barnes 2008) De 11 genes evaluados cinco fueron los mas frecuentes FepA Fiu cir IroN e iutA sin importar el serotipo o la procedencia de las cepas A pesar de la abundancia natural de hierro los microorganismos han desarrollado mecanismos de absorcion al hierro que es practicamente insoluble a pH biologico o esta conjugado con macromoleculas con transferrinas (Ocaña 2005)

Estudios genómicos realizados en cepas pusieron en evidencia genes o fragmentos de ADN específicos de cada grupo sugiriendo así su uso como marcadores moleculares para la detección de los filogrupos de *E. coli* basado en la presencia o ausencia de los genes *chuA* (necesario para el transporte del grupo hemo en EHEC O157 H7) y *yjaA* (identificado en el genoma de *E. coli* K 12 con función desconocida) y un fragmento de ADN llamado *TspE4 C2* que codifica como parte de una enzima esterasa lipasa (Clermont *et al* 2000) Los filogrupos patógenos son B2 y D y los no patógenos son A y B1 (Escobar Paramo *et al* 2005)

Los genes utilizados para determinar los grupos filogenéticos tienen una relación dicotómica a partir de la identificación de las regiones genicas mencionadas anteriormente mediante la amplificación de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Parte de la estrategia adaptativa de esta enterobacteria es el mecanismo de encendido y apagado de genes permitiéndole a la célula la capacidad de evaluar su ambiente ajustando el patrón de expresión de sus 4000 genes y migrar a regiones óptimas para su metabolismo (Clermont *et al* 2000)

Mecanismos de defensa del huésped frente a la acción del patógeno

La *E. coli* es uno de los principales agentes causante de infecciones en el tracto urinario en nuestro organismo en condiciones de normalidad presenta una serie de funciones y elementos que le permiten evitar la infección urinaria. En determinadas ocasiones estos son deficitarios y es cuando se desarrolla en la Unidad de Cuidado Intensivo (UI) (Calderon *et al* 2013) Estos elementos son

Integridad anatómica y funcional de las vías urinarias Existen circunstancias anatómicas normales que favorecen a la UI como es la longitud uretral (más larga en los hombres que en las mujeres) Otro factor importante es la integridad de las válvulas vesicouretrales que impide el reflujo urinario en caso de bacteriuria

- **Diuresis con vaciado completo.** Mecanismo de defensa, por su efecto de lavado y arrastre. Se consigue con una ingesta diaria elevada de líquidos y se encuentra alterado en la vejiga neurógena, atonía vesical, alteraciones obstructivas (patología prostática en varones).
- **Cualidades de la orina (pH, osmolaridad, urea).** La orina posee actividad antibacteriana debida a su alta concentración de ácidos grasos y urea, y a su pH bajo; con la edad disminuye la acidez de la orina y se favorece su colonización.
- **Mecanismos locales de defensa del urotelio.** Existen una serie de anticuerpos y sustancias segregadas por el epitelio del tracto urinario que impiden la adherencia bacteriana, se trata de anticuerpos locales tipo IgA secretora y la presencia de la mucoproteína de Tom Horsfall (Martínez *et al.*, 1997).

Nuevas metodologías para análisis moleculares

Las técnicas de biología molecular para la detección rápida y directa de ácidos nucleicos de diferentes microorganismos son muy útiles en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas y se hacen necesarias en la actualidad para los estudios de zoonosis, estudios a nivel de filogenia e identificación de patógenos emergentes y re-emergentes. Con estos avances es posible hacer diferencias entre cepas bacterianas y realizar estudios precisos y detallados que permitan realizar controles epidemiológicos, con la utilización de técnicas como son la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE), la ribotipificación, amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) y polimorfismo de fragmentos largos de restricción (RFLPs), metagenómica, entre otras (Máttar-Salim, 2005).

La comparación de cepas para establecer su identidad, se basa en el hecho de que las cepas relacionadas epidemiológicamente provienen de la expansión clonal a partir de un precursor o progenitor único. Existen numerosos trabajos en donde se aplican estas metodologías para el estudio de las zoonosis. La salmonelosis, las infecciones por *E. coli* 0157:H7, la brucelosis y rickettsiosis, entre otras, son algunos de los trabajos que se han realizado (Máttar-Salim, 2005).

Análisis de microorganismos por RFLPs

Es una alternativa para simplificar la interpretación de los RFLPs de ADN total consiste en centrarse en una zona concreta del genoma en lugar de estudiar todo el cromosoma. Para ello, la región de interés se corta con endonucleasas de restricción las cuales cortan el ADN en regiones específicas. Luego, los fragmentos generados son separados por electroforesis en gel de agarosa y posteriormente se transfieren a una membrana de nylon o nitrocelulosa que luego se somete a hibridación con una sonda marcada complementaria al fragmento blanco cuyo polimorfismo se requiere estudiar (Ruiz 2005). El revelado de la hibridación tan solo pondrá en evidencia aquellos fragmentos que contengan la totalidad o parte de la secuencia de interés obteniéndose perfiles con pocas bandas. El número de bandas presentes dependerá del número de copias de las secuencias existentes en el genoma mientras que su polimorfismo estará relacionado con su distribución a lo largo del genoma así como con las variaciones en los sitios de restricción dentro de esta secuencia y en las regiones más próximas (Pérez de Rosas *et al* 2003).

Ribotipificación

La ribotipificación consiste en someter a hibridación el ADN genómico de una bacteria digerido con una enzima de restricción y transferirlo a una membrana contra una sonda que sea complementaria a la secuencia de ADN de los genes del ARNr (Mattar y Salim 2005).

RAPD

Esta técnica está basada en la amplificación del genoma de ADN usando *primers* o iniciadores sencillos sobre una secuencia nucleotídica al azar. Estos *primers* producen una amplificación al azar de uno o más *loci* impredecibles. En este sentido, la técnica de PCR genera una serie de fragmentos de ADN que pueden ser utilizados para comparar poblaciones bacterianas o razas entre sí. La técnica de RAPD ha sido usada exitosamente en cepas de *E. coli* O157 H7 y ha permitido diferenciar y relacionar cepas aisladas de brotes así como cepas provenientes de animales para demostrar zoonosis (Narvaez *et al* 2000).

Metagenomica o genomica ambiental

Es el analisis genomico de poblaciones de microorganismos que se puede definir como el analisis del ADN total de una muestra ambiental. Hasta el momento se han investigado metagenomas de diversos ambientes incluyendo ecosistemas acuaticos, minas, suelos agricolas y forestales, entre otros, lo cual permite determinar la diversidad microbiana y filogenetica, diversidad metabolica y expresion genica en distintas poblaciones, permitiendo hacer una reconstruccion total o parcial de los genomas de microorganismos no cultivados (Hernandez Leon *et al* 2010).

PCR en tiempo real (PCRtr)

La PCRtr es una tecnica que combina la amplificacion y la deteccion en un mismo paso, al correlacionar el producto de la PCR de cada uno de los ciclos con una señal de intensidad de fluorescencia. Tiene características importantes como alta especificidad, amplio rango de deteccion (de 1 a 10⁷ equivalentes genomicos de la secuencia blanco) y rapidez en la visualizacion del producto, ya que no es necesario realizar una electroforesis en gel posterior (Brechtbuehl *et al* 2001).

Los ensayos de la PCRtr son entre 10 000 y 100 000 veces mas sensibles que las pruebas de proteccion por ARNasa, 11 000 veces mas sensibles que la hibridacion por *Dot Blot*, que pueden detectar diferencias de una sola copia del ADN (Wong y Medrano 2005).

Los fluoroforos utilizados para cuantificar la amplificacion del ADN durante la PCRtr pueden ser de dos tipos: a) fluoroforos con afinidad por el ADN y b) sondas especificas para fragmentos del ADN, es decir, que solo emiten fluorescencia cuando se ha amplificado un fragmento del ADN de interes. Estos fluoroforos emiten fluorescencia cuando se unen al ADN, la intensidad de la fluorescencia se incrementa proporcionalmente a la concentracion del ADN de doble cadena (estos son los utilizados en la actualidad) (Costa 2004).

Electroforesis capilar

La electroforesis capilar (CE) es una tecnica de separacion basada en la diferente velocidad de migracion de las distintas especies cargadas bajo la accion de un campo electrico. La separacion se lleva a cabo en un capilar de silice fundida de diametro muy pequeño (10-200 μm). El uso de estos capilares tiene multiples ventajas: a) los capilares son anticonvectivos en si mismos por lo tanto no es necesaria la utilizacion de un gel soporte como medio; b) el calor generado al pasar la corriente electrica (efecto Joule) que daria lugar a problemas de gradientes de temperatura no uniformes (cambios locales de viscosidad) es fuertemente reducido ya que la disipacion de calor es muy efectiva; c) pueden aplicarse altos voltajes consiguiendose una reduccion del tiempo de analisis y altas eficiencias (Osatinsky 2007).

Electroforesis de campo pulsado

El objetivo de la tecnica consiste en separar y calcular el tamaño de moleculas grandes de ADN. Tiene relevancia para analisis comparativos de patrones de restriccion cromosomicos, construccion de mapas cromosomicos, topologia y tamaño de cromosomas y analisis de elementos extra cromosomicos de peso molecular alto (Cardozo Bernal *et al* 2013).

Esta tecnica se fundamenta en la separacion de ADN de 10 kb hasta 10 Mb (Schawartz-Cantor 1984). En este metodo el ADN viaja a traves de un gel de agarosa concentrado bajo la influencia de dos campos electricos. Los dos angulos de campos electricos se encuentran cerca a la perpendicularidad, no son uniformes en la intensidad del campo y cambia de manera alterna. Cuanto mas grande sea la molecula de ADN mayor sera el tiempo para encontrar nueva orientacion y la retencion en el gel (Southern *et al* 1987).

Dentro de las aplicaciones a nivel molecular que tiene esta tecnica se encuentra la determinacion de patrones de restriccion cromosomicos y analisis comparativo ADN *fingerprinting* mediante estudio de perfiles de digestion usando enzimas de secuencias de reconocimiento largas (infrecuentes a lo largo del genoma). Tambien

tiene amplia aplicacion como tecnica de referencia para analisis filogenetico analisis del ADN mitocondrial y comparacion de ARN 16S. Ademàs se utiliza para mapas geneticos y fisicos topologia cromosomica combinando patrones de restriccion y tecnicas de hibridacion para elaborar bases de datos de mapas cromosomicos y determinar el tamaño exacto de los cromosomas (Cardozo Bernal *et al* 2013)

Cuantificacion de ADN en geles de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es un metodo normalizado que se utiliza para separar identificar y purificar fragmentos de ADN. Se trata de una tecnica sencilla y rapida que permite diferenciar fragmentos de ADN que no pueden separarse adecuadamente con otros procedimientos. Por otra parte el ADN puede localizarse en el gel tiñendo con una concentracion baja de un colorante fluorescente como el bromuro de etidio que es un agente que se intercala en el ADN y que emite fluorescencia en presencia de luz ultravioleta (UV) (Sambrook *et al* 1989)

La tecnica para la cuantificacion de ADN consiste en la utilizacion de una escalera o marcador de peso molecular con concentraciones determinadas de ADN que se comparan con muestras de ADN de concentracion desconocida. El calculo de las concentraciones se hace bajo la luz ultravioleta segun la intensidad de la fluorescencia. Debe evitarse la exposicion prolongada a la luz ultravioleta incluso con mascara de proteccion. La estimacion de las concentraciones de ADN puede realizarse sobre una fotografia digital del gel tomada bajo luz ultravioleta si se cuenta con un analizador de imagenes (Posso 2009)

Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Esta tecnica se emplea frecuentemente para la visualizacion del ADN extraido de diversos orìgenes. Se basa en la migracion que realiza el ADN cargado negativamente hacia un polo positivo al encontrarse dentro de un campo electrico a pH neutro. La tecnica se realiza en una cubeta horizontal y los geles se fotografian con un digitalizador de imagenes (Hernandez 2009)

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Este es un método *in vitro* para amplificar secuencias específicas de ADN, desarrollado por Kary Mullis en 1985 (Mullis y Faloona, 1987). Es, sin lugar a dudas, la técnica más importante y revolucionaria en biología molecular hasta la actualidad, debido a que permite obtener millones de copias de un fragmento de ADN a partir de una sola molécula. La PCR se basa en la replicación celular en la que actúan varias enzimas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde (Serrato *et al.*, 2014), haciendo de los análisis genéticos un proceso relativamente simple, con aplicaciones directas en los campos de investigación genética, diagnósticos médicos, la ciencia forense, entre otros. Por tanto, es posible extraer y amplificar material genético de individuos pertenecientes a grupos taxonómicos distintos, que tienen un efecto directo en el diagnóstico e investigación genética. Si se acierta en el gen de elección, es posible realizar un análisis comparativo de este gen a lo largo de la evolución (Bernard y Pasternak, 1998).

La PCR es una síntesis de polimerización enzimática que se realiza mediante ciclos térmicos con la intervención de la enzima polimerasa termoestable. El producto de la polimerización del primer ciclo de la reacción, sirve de molde para el siguiente, de tal forma, que el número de copias de ADN se duplica con cada polimerización. El segmento amplificado, puede visualizarse en un gel de agarosa o de poliacrilamida (Gallegos-Robles, 2009).

Un ciclo térmico de PCR comprende tres pasos: 1) Desnaturalización, separa el ADN en dos cadenas sencillas; 2) Hibridación del iniciador a la molécula molde; 3) Extensión del iniciador mediante una polimerización, en dirección 5' a 3' por medio de una ADN polimerasa y desoxiribonucleótidos trifosfatados (dNTPs). Esta extensión de los iniciadores resultará en la síntesis de una cadena de ADN complementaria. Los tres pasos anteriores constituyen un ciclo y dan como resultado que la molécula de ADN de doble cadena sea copiada para producir 2 cadenas de ADN "hijas". Sin embargo, es necesario para obtener los resultados deseados, estandarizar la técnica con la

cantidad optima de reactivos para la PCR y la seleccion de las temperaturas adecuadas en el termociclador (Silva *et al* 1999)

PCR multiplex (PCRm)

Desde su descripcion por Chamberlain *et al* (1988) con la finalidad de amplificar locis multiples para el gen de la distrofia muscular en humanos la PCRm ha sido aplicada en muchas areas para el analisis simultaneo de marcadores multiples incluyendo delecciones mutaciones polimorfismo analisis cuantitativo por transcriptasa reversa (RT) y por RT PCR (Elnifro *et al* 2000) Ademias ha sido empleada en analisis de microsatelites deteccion de organismos geneticamente modificados (OGMs) deteccion de patogenos y tipificacion de diferentes cepas con optimos resultados (Fernandez *et al* 2010 Alvarez *et al* 2004)

En el campo epidemiologico su importancia crece por la factibilidad de aumentar en una sola reaccion la deteccion simultanea de varios microorganismos aprovechando entre otros parametros la similitud de cuadros clinicos A su vez se han desarrollado protocolos de PCRm muy prometedores mediante la utilizacion de PCRtr de forma que se puede monitorizar la cinetica de reaccion conocer la cantidad de ADN molde y/o detectar la presencia de variaciones geneticas (Shemis *et al* 2012 Lee *et al* 2010)

La PCRm consiste en la amplificacion simultanea de diferentes secuencias diana (utilizando multiples pares o juegos de iniciadores) a partir de una sola muestra Esta metodologia genera una serie de productos de diferentes tamanos que pueden verse como multiples bandas en un gel de agarosa Es de gran utilidad en el diagnostico medico para diferenciar entre agentes patogenos que producen cuadros clinicos o sintomatologia similar Entre las ventajas de esta tecnica tenemos el ahorro de tiempo y de gastos Sin embargo requiere una cuidadosa optimizacion para garantizar la union de los iniciadores de forma especifica a su secuencia blanco (Martinez y Rincon 2004)

Determinacion de grupos filogeneticos de los aislados de *E coli*

La *E coli* se clasifica desde el punto de vista de su estructura poblacional en cuatro grupos filogeneticos predominantes A B1 B2 y D (Selander *et al* 1986 Herzer *et al* 1990 Clermont *et al* 2000) los cuales pueden ser divididos en siete subgrupos (A0 A1 B1 B2 2 B2 3 D1 y D2) (Escobar Paramo *et al* 2004 Carlo *et al* 2010) Los filogrupos fueron identificados por PCRm basada en la amplificacion de dos genes con funcion conocida (*chuA* y *yjaA*) y un fragmento de ADN de funcion desconocida (*TspE4 C2*) aplicando el criterio mostrado en la figura 3 que permitio hacer la discriminacion de los aislados estudiados en los correspondiente grupos filogeneticos B2 (*chuA* + *yjaA* +) D (*chuA* + *yjaA*) B1 (*chuA* *TspE4 C2* +) y A (*chuA* *TspE4 C2*) (Clermont *et al* 2000)

Las cepas de *E coli* extraintestinales patogenas pertenecen en su mayoria a los grupos B2 y D mientras que las cepas comensales intestinales se distribuyen entre los grupos A y B1 (Picard *et al* 1998 Soto 2006)

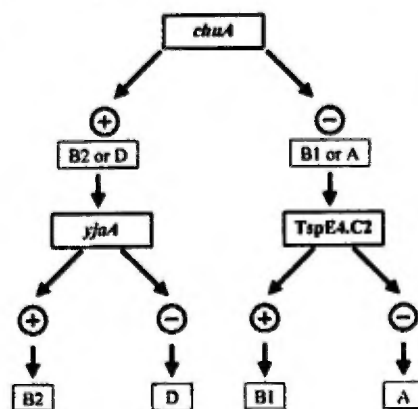


Figura 3 Arbol de clasificacion dicotomica para determinar el grupo filogenetico de aislados de *E coli* usando los resultados de amplificacion por PCR de los genes *chuA* y *yjaA* y del fragmento de ADN *TspE4 C2* (Tomado de Clermont *et al* 2000)

Cepas de *E coli* ampliamente estudiadas y de importancia en el analisis filogenetico

La cepa K12 de *E coli* ha sido muy estudiada y el genoma completo de una variante de esta cepa fue secuenciado (Blattner *et al* 1997) Esta cepa contiene 4 639 221 mega

pares de bases (Mpb) de ADN circular de doble cadena. El 87.8% de este genoma codifica para proteínas, el 0.8% codifica para ARNs y 0.7% consiste en ADN repetido sin función conocida. Se estima que alrededor del 11% del cromosoma tiene funciones de regulación. Un 28% de los 4288 marcos de lectura abierta (ORFs) no tienen función conocida. Es posible que otras cepas de *E. coli* tengan diferencias en su estructura genómica, ya que se sospecha que los mapas no siempre son colineales y hay variación en el tamaño del genoma de 4.4 a 5.5 Mpb (Shu Liu *et al* 1993).

La otra cepa patógena secuenciada completamente es la EHEC O157:H7, la cual ha sufrido numerosos eventos de transferencia horizontal desde que se separó de la K12 hace aproximadamente 4 millones de años y tiene 1387 genes diferentes, los cuales incluyen factores de virulencia, diferentes rutas metabólicas, profagos, transposones y funciones desconocidas (Perna *et al* 2001).

El estudio comparativo de estos dos genomas indica que las enterobacterias están sujetas a mucha más recombinación vía transferencia horizontal de lo que se había sospechado. Este proceso genera genomas bacterianos que consisten en mosaicos de genes con diferentes historias evolutivas (Perna *et al* 2001).

La *E. coli* está presente en diferentes nichos ecológicos y se ha descrito como microorganismo comensal o patógeno en personas y animales. En el tracto digestivo, las cepas comensales se localizan principalmente en el ciego y en el colon, específicamente en la capa mucosa que recubre las células epiteliales, siendo continuamente eliminadas al lumen intestinal y excretadas al exterior a través de las heces (Tenailon *et al* 2010). Este microorganismo es responsable de enfermedades intestinales y extraintestinales en personas, así como de infecciones en el medio intrahospitalario (Olaechea *et al* 2010). En animales de abasto y de compañía, la *E. coli* participa en el síndrome diarreico transmitido por conejos, ganado porcino, bovino y ovino, y causa infecciones extraintestinales en perros y gatos, rumiantes y cerdos, e infecciones respiratorias y septicemia en aves (Blanco *et al* 2002).

Es la causa mas frecuente de infeccion urinaria y en menor medida de otras infecciones como meningitis en el neonato o infecciones respiratorias (Valdevenito 2008) Entre los tipos de *E coli* que producen gastroenteritis la mas destacada por su patogenicidad es la denominado EHEC que produce un cuadro clinico que va desde dolores estomacales hasta vomitos y diarrea y en muchas ocasiones causa diarrea sanguinolenta La gastroenteritis es definida como una inflamacion del estomago y de los intestinos (Gomez *et al* 2005)

La Organizacion Mundial de la Salud (OMS) estima que hasta un 10% de los pacientes con infeccion por EHEC pueden desarrollar el sindrome hemolitico uremico (SHU) con una tasa de letalidad de entre 3% y 5% globalmente El SHU es la causa mas comun de insuficiencia renal aguda entre niños de corta edad (Rivero *et al* 2004)

En Panama los casos de gastroenteritis aumentan considerablemente en epoca lluviosa incrementando los cuadros de vomitos y diarreas Sin embargo hay que destacar que en Panama se mantiene un reservorio de materia fecal en la zona sur de la poblacion especificamente en la Bahia de Panama que podria influir en brotes en las escuelas hospitales y comunidades aledañas a traves del contacto directo de sus aguas y aire contaminados Es por estas razon que es importante determinar los grupos filogeneticos de las cepas de *E coli* que estan circulando en nuestro pais ya que brindaria informacion a las autoridades de salud sobre la distribucion de las cepas patogenas en la poblacion y sus mecanismos de accion y resistencias

A pesar que la *E coli* es la bacteria mas estudiada en cuanto a su filogenia y genetica curiosamente los mecanismos patogenicos que operan en las enfermedades producidas por este microorganismos no han sido estudiadas con la atencion necesaria Solo recientemente algunos investigadores en varias partes del mundo se han preocupado por diversos aspectos de la patogenesis de la colibacilosis

Entre ellos podemos citar los siguientes autores:

Fernández (2012), en Argentina estudia que la *E. coli verotoxigénica* es causante de brotes y casos esporádicos de colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH). En Argentina el SUH es endémico, con 500 nuevos casos por año y una incidencia de 17/100,000 niños menores de 5 años. El serotipo aislado con mayor frecuencia es el O157:H7, aunque hay serotipos no-O157 que están asociados con la enfermedad en el hombre. La transmisión de VTEC al hombre se produce por el consumo de carne mal cocida, de verduras y agua contaminadas por heces de portadores, así como por el contacto persona-persona y con el medio ambiente contaminado. Los tambos pueden contribuir al riesgo de infección por VTEC en humanos mediante el consumo de leche cruda, de productos lácteos o carne contaminada proveniente de bovinos lecheros y también, a través del propio medio ambiente del tambo. Existe una amplia distribución y una alta prevalencia de serotipos VTEC en bovinos lecheros de Argentina, por lo cual, es importante aplicar medidas de control y manejo que eviten la transmisión de cepas entre animales, ambiente y humanos.

En Venezuela, Hannaoui *et al.* (2009), describen la patogenicidad, diagnóstico y tratamiento de la infección producida por (ECST) *E. coli Shigatoxigénica*, en el cual afirma que la toxina shiga es el principal determinante de la patogenicidad de ECST y su síntesis está relacionada con la presencia de un bacteriófago Stx que está insertado en el genoma, ésta toxina daña las células intestinales, vasculares y renales, son codificados por genes que pueden ser adquiridos por transferencia horizontal.

Vidal Graniel (2003) en México, publicó el artículo *E. coli* enteropatógena (EPEC), una causa de frecuente diarrea infantil en donde explica que la EPEC, es una bacteria que infecta principalmente a niños menores de dos años provocando diarreas de diversos grados. La EPEC utiliza una variedad de factores de virulencia para causar el daño mediante un mecanismo complejo. A nivel intestinal induce una alteración histopatológica conocida como la lesión A/E (adherencia y esfacelamiento) que se caracteriza por la degeneración de las microvellosidades del enterocito. La lesión se

induce principalmente por la acumulacion de la actina intracelular en la region apical de la celula justo por debajo de la bacteria adherida este desarreglo que sufre el citoesqueleto parece formar una estructura tipo pedestal La diarrea secretoria causada por EPEC esta relacionada con la salida masiva de iones lo cual parece ser una consecuencia del desarreglo del citoesqueleto la destruccion de las microvellosidades y la secrecion de alguna enterotoxina

Barreto (2006) en cuba realizo un estudio acerca de *E coli enterohemorrágica* como causa de cuadros diarreicos en niños menores de cinco años El mismo se efectuó en el Centro Provincial de Higiene Epidemiología y Microbiología (CPHEM) de Camaguey desde julio a diciembre de 2004 con el objetivo de establecer la frecuencia de presentacion de este enteropatogeno en los infantes Se estudiaron 174 muestras de heces fecales Se presento la categoria enterohemorrágica en el 10 4 % de los pacientes con *E coli* Predomino el grupo de los menores de seis meses y el sexo femenino (60%)

Cada uno de los parrafos anteriores basados en investigaciones realizadas por diferentes autores en distintos paises confirman la importancia de realizar estudios que nos lleven a determinar con mayor claridad los mecanismos de patogenicidad de *E coli* y de esa forma poder aplicar medidas de control y manejo que eviten la transmision de cepas entre animales ambiente y humanos

OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar los grupos filogenéticos o filogrupos a los que pertenecen las cepas de *E coli* aisladas de muestras de heces de animales y humanas y de agua provenientes de tres poblados de Panama

Objetivos Específicos

- Determinar la prevalencia de los filogrupo de *E coli* A B₁ B₂ y D en la poblacion de estudio por medio de los cebadores ChuA YjaA TspE4 C2
- Identificar las cepas potencialmente patógenas de acuerdo al filogrupo al cual pertenecen
- Investigar la posible relacion entre los aislados de *E coli* en las distintas muestras empleando la agrupacion por filogrupos
- Establecer la difusion y persistencia de genes de mayor patogenicidad en la poblacion de estudio

MATERIALES Y MÉTODOS

Punto de Muestreo

Estas muestras fueron aisladas previamente y se encuentran ubicadas en el Laboratorio de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA)(Batista y Yee 2010) En un breve resumen se explica los sitios de muestreo de las cepas utilizadas en este estudio Para obtener una muestra lo suficientemente representativa se establecieron 3 sitios de muestreo en poblados distintos del país en cada sitio se realizaron colectas de 10 muestras de materia fecal (heces) de vacas cerdos gallinas y de las personas residentes y también de muestras de agua de fuentes cercanas a las áreas muestreadas para su análisis

Uno de los sitios de muestreo corresponde a La Ciudad del Niño ubicado a pocos metros de la autopista Panama Chorrera detras del Hospital Nicolas Solano provincia de Panama Oeste Es una aldea creada en 1968 para albergar a niños entre edad de 5 a 13 años provenientes de hogares desintegrados por el vicio violencia domestica y riesgo social En el sitio se trabaja el cultivo y cria de animales de corral

Otro es en el corregimiento de El Arado distrito de La Chorrera provincia de Panama Oeste limita al norte con el distrito de Arraijan al sur por el corregimiento de Barrio Colon al este por el distrito de Arraijan y al oeste por el corregimiento de La Represa y Herrera Tiene una superficie de 54 6 km² y una poblacion estimada al año 2007 de 2 485 habitantes

Por ultimo el corregimiento de Escobal en la provincia de Colon ubicado en la zona oeste de Colon Es un area rural de actividad residencial poblado por inmigrantes de otras regiones del país que buscaban tierras apropiadas para el desarrollo de la agricultura y ganaderia Este sitio tiene una fuerte influencia de visitantes ya que esta ubicada en los linderos del lago Gatun

Preparacion de medio de cultivo y crecimiento bacteriano

Se prepararon 150 tubos con 5 mL de Caldo Trypticase y Soya (CTS) se peso 24 gramos (g) de este reactivo que se mezclaron con 800 mL de agua destilada y luego se sirvieron 5 mL en cada tubo los cuales fueron llevados a la autoclave para su

esterilizacion

Para el crecimiento de las bacterias se procedio a inocular las cepas de *E coli* previamente descritas y conservadas en LAMEXA (Batista Yee 2010) en cada tubo con 5 ml de Caldo Tripticasa y Soya y luego se incubaron a 37°C durante 24 h

Procesamiento molecular de las cepas

Extraccion de acidos nucleicos

La extraccion de acidos nucleicos fue realizada como lo describe Sambrook y Russell (2001) En resumen se colecto 1.5 mL de *E coli* crecida en CTS por centrifugacion a 4000 rpm durante 5 min y esto se repitio una vez mas hasta obtener un pellet lo suficientemente grande de la muestra de bacteria Este pellet se mezclo con 200 µl de la solucion de lisis que contenia 40mM Tris Acetato pH 7.8 20 mM de acetato de sodio 1mM de EDTA y 1% de SDS Despues se mezclaron fuertemente en el vortex hasta que se disolvio el pellet y se le agrego 66 µl de NaCl 5 M Luego se centrifugo nuevamente por 14000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente (TA) transfiriendo el sobrenadante a un tubo nuevo cuantificando el volumen y despues se le añadio el mismo volumen de cloroformo invirtiendo suavemente unas 5 veces hasta que una solucion lechosa se formara Luego se centrifugo a 14000 rpm durante 5 min y se extrajo el sobrenadante cuidadosamente cuantificandolo para que posteriormente se mezclara con el doble de isopropanol 100% frio y se centrifugo a 14000 rpm durante 5 min Seguido se elimino el sobrenadante y el pellet se lavo una vez con etanol al 70% se dejo secando a TA y se resuspendio con 20-25 µl de agua esteril libre de nucleasas Se mantuvo la solucion de acido nucleicos a 20°C hasta su utilizacion

Preparacion de los geles

Para la preparacion de la camara de electroforesis se colocaron los peines se peso la agarosa y se disolvio en agua destilada en un microonda para una concentracion de 1.5% Luego de atemperar la solucion se le añadio bromuro de etidio 0.5 µg/ml (5 -

7.5 µl según el tamaño de la cubeta que se iba a utilizar) y se vertió a la cámara de electroforesis dejando solidificar. Posteriormente se llenó con el tampón Tris Ácido Borico EDTA (TBE) a una concentración de 0.5 X. Las muestras se mezclaron con 2 µl del tampón de corrida (*loading buffer*) y luego se depositaron en cada pocillo corriéndose a 120 voltios durante 1 h. Finalmente se observó en un fotodocumentador con trasiluminador de luz ultravioleta (UV) para tomarle una foto y registrar los resultados.

Este paso se realizó para verificar la presencia de ADN bacteriano luego de la extracción de ADN y de la PCR.

Condiciones de la amplificación para la determinación de los grupos filogenéticos de las muestras retrospectivas de *E. coli* pertenecientes a LAMEXA Universidad de Panamá

Condiciones de amplificación del gen *chuA*: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min; 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C – 30 seg, hibridación a 63 °C – 30 seg y extensión a 72 °C – 30 segundos; un ciclo de extensión final a 72 °C durante 7 min y a 4 °C durante el infinito (Clermont *et al* 2000).

Condiciones de amplificación de los genes *YjaA* y *TspE4C2*: 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min; 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C – 30 seg, hibridación a 55 °C – 30 seg y extensión a 72 °C – 30 seg; un ciclo de extensión final a 72 °C durante 7 min y a 4 °C durante el infinito (Clermont *et al* 2000).

El protocolo empleado para la identificación y amplificación individual de los tres marcadores incluyó tres reacciones de PCR simple. Las concentraciones finales de cada uno de los componentes empleados fueron ajustadas a un volumen final de reacción de 25 µL.

Cuadro 1. Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación y determinación de los grupos filogenéticos de aislados de *E. coli*.

Primeros de PCR				
Gen	Secuencia 5'→3'	Dirección	Tamaño del amplicon	Referencia
<i>chuA</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT	Sentido	279 pb	Clermont <i>et al.</i> , 2000
	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	Antisentido		
<i>yjaA</i>	TGAAGTGTCTCAGGAGACGCTG	Sentido	211 pb	
	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	Antisentido		
<i>TspE4C2</i>	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA	Sentido	152 pb	
	CGCGCCAACAAAGTATTACG	Antisentido		

Cuadro 2. Concentraciones de los reactivos utilizados para la mezcla PCR.

	Concentración final	1x µl	15x	25x	50x	100x
Agua		17.4	261	435	870	1740
Buffer 10x	1x	2.5	37.5	62.5	125	250
MgCl2 25 mM	1.5	1.5	22.5	37.5	75	150
dNTPs 25 mM	0,5 mM	0.5	7.5	12.5	25	50
<i>chuA1</i> 25 µM	0,3 µM	0.3	4.5	7.5	15	30
<i>chuA2</i> 25 µM	0,3 µM	0.3	4.5	7.5	15	30
Taq Pol 5 U/µl	2.5 U/ µl	0.5	7.5	12.5	25	50
Total		23	345	575	1150	2300
Muestra de ADN		2	3.0	5.0	100	200

Evaluacion de los resultados

Despues de la amplificacion de los ADN de cada cepa por PCR se tomaron los tamaños de los fragmentos que aparecen en la Cuadro 1 y se comparo con un marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb) en una electroforesis de agarosa al 1.5% (como se describio arriba) para considerar a que filogrupo pertenece cada cepa

RESULTADOS

El Análisis de los grupos filogenéticos de *E. coli* se determinaron por la presencia o ausencia de los genes indicados por los primers o cebadores que flanquean específicamente a los genes *YjaA*, *ChuA* y *TspE4C2* (Clermont *et al.*, 2000). Este estudio mostró, que de 140 muestras analizadas 16 (11.43%) muestras se ubicaron en el filogrupo B2, siete (5.00%) en el filogrupo D, una (0.7%) en el filogrupo B1 y 116 (82.86%) en el filogrupo A1 (Cuadro 3 y 6; Fig. 5).

Cuadro 3. Presencia o ausencia de los genes *ChuA*, *YjaA* y *TspE4C2*, que se obtuvieron en las diferentes muestras de los sitios de colecta. Cada sitio ha sido dividido por colores.

Lugar			Genes								
Ciudad del niño	Escobal	El Arado	ChuA	YjaA	TspE4C2	ChuA	YjaA	TspE4C2	ChuA	YjaA	TspE4C2
CiAg1		ARAg 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiAg2	EAg2		0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiAg3		AAG 3	1	1	0	0	0	0	0	0	0
CiAg4			0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiAg5		AAG 5	1	1	0	0	0	0	0	0	0
CiAg6	EAg6	AAG 6	0	0	0	0	0	0	1	1	0
CiAg7	EAg7		0	0	0	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiAg9	EAg9	AAG 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiAg10		AAG10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiCe 1	ECe1	ACe1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
CiCe 2	ECe2		0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiCe3		ACe 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiCe 4		ACe 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiCe 5	ECe 5		0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiCe 6	ECe 6		0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiCe7	ECe 7	ACe 7	0	0	0	1	1	0	0	0	0
CiCe 8	ECe 8	ACe 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		ACe 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiCe 10			0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ece11	ACe 11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		AGa 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiGa 2	EGa 2	AGa 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiGa 3		AGa3	1	0	0	0	0	0	1	0	0
CiGa 4	EGa 4		0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiGa 5	EGa 5	AGa 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiGa 6			1	1	0	0	0	0	0	0	0
CiGa 7	EGa 7		1	1	0	0	0	0	0	0	0
CiGa 8		AGa8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiGa 9	EGa 9	AGa 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0	0	0	0

CiGa 10B				0	0	0	0	0	0	0	0
		AGa 11	0	0	0	0	0		0	0	0
CiHu 1	EHu 1	AHu 1 A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiHu2	EHu 2	AHu 2 A	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiHu 3	EHu 3	AHu 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiHu 4		AHu 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiHu5	EHu 5	AHu 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiHu6		AHu 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiHu 7	EHu 7		1	0	0	0	0	0			
CiHu 8	EHu 8		1	1	0	0	0	0			
CiHu9	EHu 9		0	0	0	0	0	0			
CiHu 10	EHu 10		0	0	0	0	0	0			
CiVa 1			0	0	0			1			
	Eva 2		0	0	0	0	0	0			
CiVa 3	Eva 3	AVa 3	1	1	0	0	0	0	0	0	0
CiVa 4	Eva 4		1	1	0	0	0	0	0	0	
CiVa 5	Eva 5	AVa 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CiVa 6	Eva 6	ARV6	0	0	0	0	0	0	1	0	0
CiVa 7		ARV7	0	0	0				1	0	0
CiVa 8		ARVa 8	0	0	0				1	0	0
CiVa 9	Eva 9		0	0	0	0	0	0			
CiVa 10			0	0	0						
	EVa 11	AVa 11				0	0	0	0	0	0
			8	7	0	1	1	0	5	1	0

1= hace referencia a la presencia de genes para la identificación filogenética y 0= a la ausencia de genes en la muestra. CiAg: muestra de *E. coli* de Ciudad del Niño proveniente de agua, CiCe: muestra de *E. coli* de Ciudad del Niño proveniente de heces de cerdo, CiGa: muestra de *E. coli* de Ciudad del Niño proveniente de heces de gallina, CiHu: muestra de *E. coli* de Ciudad del Niño proveniente de heces humanas, Civa; muestra de *E. coli* de Ciudad del Niño proveniente de heces de vaca.



Figura 4. Porcentaje de filogrupos de *E. coli* distribuidos en los distintos puntos de muestreo, en base al número total de cepas.

La prevalencia de las cepas patógenas en sitios específicos de estudio, al compararla se obtienen un 6.42% (9/140) de cepas del filogrupo B2 en La Ciudad del Niño, 2.14% (3/140) filogrupo B2 de Escobal; 2.85% (4/140) filogrupo B2 del Arado; 4.28% (6/140) filogrupo D del Arado y 0.71% (1/140) filogrupo D de Ciudad del niño (Cuadro 4).

Cuadro 4. Prevalencia de cepas potencialmente patógenas relacionadas con cada filogruppo.

Distribución de grupos filogenéticos de las cepas de <i>E. coli</i> ambientales	<i>B-2</i> <i>positivos para YjaA</i>	<i>D</i> <i>Negativos para YjaA</i>	<i>B1</i> <i>Positivo para TspE4C2</i>
	<i>C1Ag3</i>	<i>ARV7</i>	<i>E. coli tipo II # 7</i>
	<i>CiAg5</i>	<i>ARVo8</i>	
	<i>CiAg8</i>		
	<i>CiCe 1</i>	<i>ARV6 A</i>	
	<i>CiGa6</i>	<i>ARg 3A</i> <i>Ciga3</i>	
	<i>CiGa 7</i>	<i>ACe 7A</i>	
	<i>Cihu8</i>		
	<i>CiVa4</i>	<i>AAg3</i>	
	<i>CiVa 5</i>		
	<i>ECE 7</i>		
	<i>EGA10B</i>		
	<i>Eva5</i>		
	<i>AAg6</i>		
	<i>AHu1A</i>		
	<i>AHu2A</i>		
	<i>AHu3A</i>		
	Total	16	7
			1

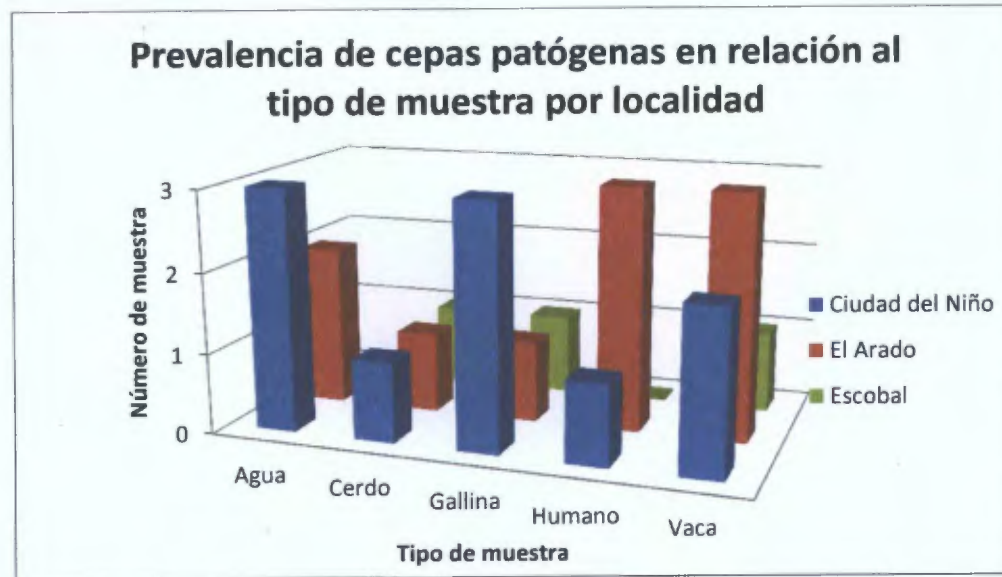


Figura 5. Relación entre el número de cepas potencialmente patógenas por tipo de muestra y sitio de muestreo.

Descripción de las cepas de *E. coli* obtenidas en el punto de muestreo de El Escobal.

Basadas en las cepas estudiadas de El Escobal, solamente tres resultaron dentro de los filogrupos de cepas patógenas, las cuales pertenecían al filogrupo B2, representando el 6.25% (3/48) el resto de las 45 cepas se consideran cepas comensales que equivalen al 93.75% (45/48) (Fig. 6).

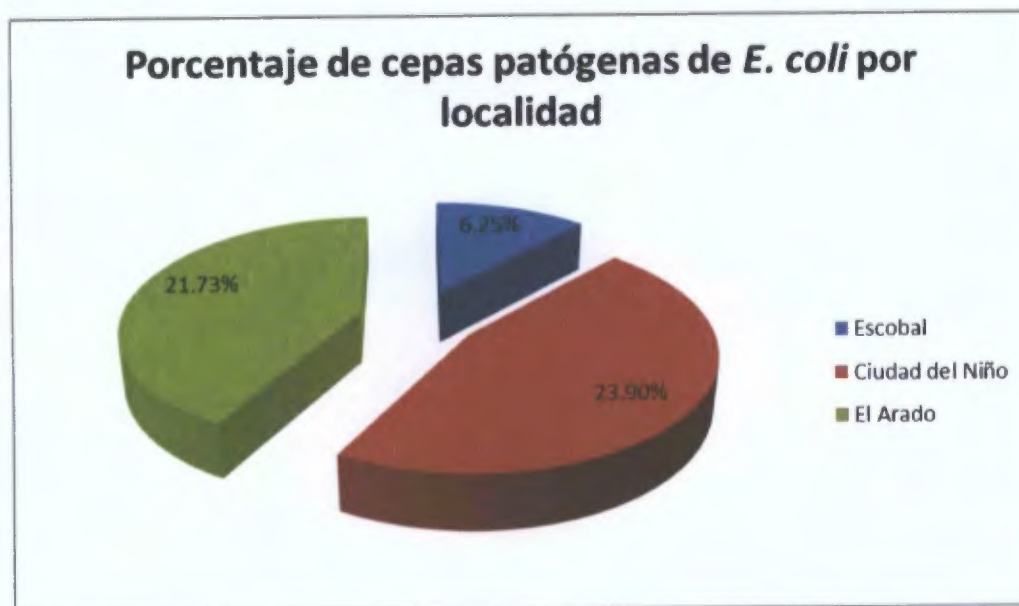


Figura 6. Porcentaje de cepas patógenas por localidad en base al número de muestras estudiadas en cada sitio.

Identificación de cepas potencialmente patógenas en La Ciudad del Niño

De las 46 cepas estudiadas en este punto de muestreo, once resultaron dentro de los filogrupos de las cepas patógenas, tres provenientes de muestras de agua, dos de heces de cerdo, tres de heces de gallina, una de heces de humanos y dos de heces de vacas. Esto equivale a un 23.9% (11/46) de cepas patógenas que circularon en este sitio y 76.09% (35/46) de cepas comensales. Cabe destacar que de las 11 muestras patógenas obtenidas de Ciudad del Niño, ocho pertenecen al filogrupo B2 equivalente al 72.72% (8/11) y tres al filogrupo D equivalente a 27.28% (3/11) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Distribución de los genes para el análisis filogenético por localidad de muestreo.

Lugar Genes	CIUDAD DEL NIÑO	ESCOBAL	EL ARADO
ChuA	10	1	5
YjaA	8	1	1
Total	18	2	6

Descripción de las Cepas de *E. coli* obtenidas en la comunidad de El Arado

De la comunidad de El Arado, se estudiaron 46 cepas de las cuales 21.73% (10/46) correspondieron a cepas patógenas y 78.26% (36/46) a cepas comensales, respectivamente. De esos 8.69% (4/46) pertenecían al filogrupo B2 y 13.04% (6/46) al filogrupo D).

Estas cifras están relacionadas con distintos tipos de muestras ambientales de las cuales 4.34% (2/46) pertenecían a muestras de origen hídrico, una 2.17% (1/46) de gallina, tres 6.5% (3/46) de vaca; uno 2.71% (1/46) de cerdo y tres de humano 6.52% (3/46).

Prevalencia de genes para la identificación de filogrupos por tipo de muestra.

Al relacionar los resultados por tipo de muestra y la identificación de genes, se obtuvo que cuatro muestras de agua resultaron positivas para *ChuA* y *YjaA* (cuadro 4).

Cuadro 6. Prevalencia de genes para la identificación de filogrupos por tipo de muestra.

Fuente Genes	AGUA	CERDO	GALLINA	HUMANA	VACA
ChuA	2	1	3	2	2
YjaA	2	1	2	1	2
TspE4C2	0	0	0	0	1
Total	4	2	5	3	5

Cuadro 7. Distribución de genes potencialmente patógenos en el área de estudio.

GENES	NEGATIVO	POSITIVO
ChuaA	117	0
TspE4C2	116	1

Las cepas resultantes negativas para ChuA pueden identificarse en el filogrupo B1 y A1 en donde el resultado fue de 83.57% (117/140) de los cuales 0.71% (1/140) son B1 y 82.85% (116/140) son del filogrupo A1.

DISCUSIÓN

Los climas tropicales de muchos países de la región son el medio ideal para la proliferación de ciertas enfermedades que no conocen fronteras geográficas. Los lazos culturales, comerciales y turísticos que unifican los países son otro factor que hace de los contagios un claro factor de riesgo. Estos factores son descritos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su escrito titulado cambios climático salud humana y riesgos (OMS 2002).

Las enfermedades gastrointestinales son uno de los principales problemas de salud pública en los países de América Latina (Hernández 2011). Se transmiten ya sea por vía fecal-oral o bien por el consumo de agua y alimentos contaminados. Afectan principalmente a la población infantil y tanto su incidencia como su prevalencia dependen del nivel socioeconómico de los pacientes. Los principales agentes patógenos involucrados son virus, parásitos y bacterias. La búsqueda e identificación de estos en los laboratorios clínicos se centra principalmente en patógenos clásicos como *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia*, *Vibrio*, *Campylobacter* y *Yersinia* (Vila 2009). Existen otros géneros involucrados en estas enfermedades como *Aeromonas* que en otros países se ha documentado como agente etiológico de enfermedades gastrointestinales y marcador de contaminación fecal en el agua (Arcos 2005).

Hay evidencia de investigaciones sobre determinación de grupos filogenéticos de *E. coli* obtenidos de muestras clínicas; sin embargo, es difícil encontrar estudios a nivel regional de identificación de filogrupos en muestras ambientales, siendo aquí el caldo de cultivo para las enfermedades que se presentan a nivel clínico.

La detección de *E. coli* patógenas intestinales es posible mediante ensayos de amplificación de ADN, los cuales son capaces de amplificar genes de virulencia específicos para cada uno de los seis tipos de *E. coli* diarrenogénicas descritos. Este tipo de ensayo no está disponible en la mayoría de países en vía de desarrollo, lo cual ha limitado su utilización en vigilancia epidemiológica para evaluar el impacto que las cepas de *E. coli* diarrenogénicas puedan tener en la población en general y pediátrica (Camargo 2014).

En el presente trabajo se evalúan los grupos filogenéticos identificados en muestras ambientales de tres poblados en Panamá. Los resultados obtenidos muestran poca o ninguna relación entre el tipo de muestra y la afinidad de los grupos filogenéticos de *E. coli* indicando que los mismos se encuentran segregados en el ambiente de manera uniforme. Estos datos nos deben llevar a la mejora de los programas de vigilancia a nivel de enfermedades zoonóticas y patógenos provenientes del ambiente ya que anteriormente lo que se conocía como cepas comensales hay evidencia que demuestran que esos patrones están en variación debido a mutaciones. Esto lo sustenta el estudio de Moreno *et al* (2006) que encontró que los aislados de *E. coli* de los grupos filogenéticos A y B1 se han mostrado capaces de producir tanto cistitis como pielonefritis, sepsis urinaria y sepsis de otros orígenes lo que concuerda con lo observado por Johnson *et al* (2005) que no encontraron diferencias significativas en la distribución de los grupos filogenéticos entre los *E. coli* causantes de cistitis, pielonefritis y prostatitis.

Es decir, los aislados de *E. coli* de los grupos filogenéticos no patógenos A y B1 pueden producir tanto infecciones del tracto urinario como otras infecciones extraintestinales (Moreno *et al* 2006).

En la Ciudad del Niño, provincia de Panamá Oeste, se registró que el 23.9% de las cepas patógenas de ellas un 72.72% pertenecen al filogrupo B2 indistintamente del origen de la cepa (Figura 6, cuadro 4). El porcentaje encontrado guarda relación con otros estudios ya que este filogrupo junto con el filogrupo D son encontrados en menor proporción (Escobar Paramo 2006). Es importante señalar que la determinación de los filogrupos potencialmente patógenos no guarda mayor afinidad a ningún tipo de muestra en especial sino que se encuentran distribuidas de manera uniforme en el ambiente.

Con el hallazgo de estos resultados es importante el monitoreo de esta zona ya que La Ciudad del Niño alberga una población que pudiese tener un nivel alto de

vulnerabilidad por tratarse de infantes. Así mismo se ha reportado que las cepas del grupo B2 son menos resistentes a los antibióticos que las cepas que no pertenecen a este grupo (Johnson *et al* 1991). Este grupo parece poseer rasgos aun no identificados que mejoran su supervivencia en el intestino humano (Nowrouzian *et al* 2005) y que persisten durante más tiempo en infantes que otras cepas (Gordon *et al* 2008).

Basados en estudios previos se resalta que las enfermedades en el tracto urinario y extraintestinales pueden afectar a personas adultas sanas pero principalmente a los pacientes con factores que favorecen la infección como los niños. Esta información la comparamos con el trabajo realizado por Pigrau (2011) sobre ITU (infección en el tracto urinario) que revela que más del 95% de la ITU están causadas por *E. coli* y que en la mayoría de los casos causa episodios de cistitis aguda y es el responsable de más del 80% de pielonefritis aguda y gran número de estas en ancianos que no han sido intervenidos.

En el 2005 Andreu basándose en criterios genéticos y clínicos de las cepas de *E. coli* describe que se clasifican en 3 grupos: cepas comensales, cepas patógenas intestinales y cepas patógenas extraintestinales.

Las cepas comensales constituyen el núcleo de la flora fecal en humanos sanos y también en otros mamíferos y aves. Estas cepas adaptadas a una pacífica convivencia con el huésped no producen enfermedad intestinal y solo causan infección extraintestinal cuando existen factores favorecedores como sondas urinarias, deterioro de las defensas, etc. Al igual que autores previos Echeverría (2006) indica que más del 95% de los casos un único microorganismo es el responsable de la ITU. El agente etiológico más frecuente de ITU en ambos sexos es la *E. coli* que es responsable del 75 a 80% de casos; el 20% a 25% restante incluye microorganismos como *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella* sp, *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* (Echeverría 2006).

Segun Duarte (2014) las cepas de *E coli* patogenas intestinales son causas importantes de la enfermedad diarreica aguda (EDA) en niños menores de 5 años en America Latina Africa y Asia y estan asociadas a alta mortalidad en niños en las comunidades mas pobres de Africa y el Sudeste Asiatico La EDA es tambien una de las causas mas importantes de morbilidad en paises en via de desarrollo y paises industrializados Se estima que mil millones de episodios de diarrea ocurren anualmente en niños en el mundo (Thapar y Sanderson 2004)

Estudios sobre el papel de las *E coli* patogenas intestinales en la EDA infantil en Colombia y otros paises de America Latina son limitados debido a la carencia de ensayos para deteccion de estos patogenos en los laboratorios clinicos de centros de salud Estudios recientes han reportado la deteccion de *E coli* patogenas intestinales en Colombia siendo la *E coli* enterotoxigenica (ETEC) la cepa mas frecuentemente asociada a diarrea en niños menores de 5 años (Duarte 2014 Amorin 1999)

De acuerdo a la descripcion de las cepas de *E coli* obtenidas en el punto de muestreo de Escobal donde se obtuvo 6 25% de las cepas correspondientes al filogrupo B2 y el resto corresponden a un numero mayor de cepas comensales Es preciso indicar que esta zona de estudio esta caracterizada principalmente por su actividad agricola y ganadera y que el 5 70% (8/140) de las muestras corresponden a cepas obtenidas de heces de cerdo y vaca sin contar el aporte de las aves de corral Siendo este punto una zona de mayor actividad agricola y ganadera

Algunos autores han analizado la distribucion de los principales grupos filogeneticos entre las cepas de *E coli* aisladas de heces humanas y animales Gordon y Cowling (2008) observaron que la prevalencia y la distribucion de los grupos filogeneticos entre los mamiferos es dependiente de la dieta del hospedero morfologia intestinal la masa y temperatura corporal asi como el clima reportando una prevalencia de las cepas del grupo B2 entre los mamiferos herbivoros y omnivoros y de cepas del grupo B1 entre las aves y los mamiferos carnivoros

Estos datos encontrados en nuestro estudio concuerdan con los reportados por Leicointre *et al* (1988) Walk *et al* (2007) demostraron que la mayoría de las cepas de *E coli* que son capaces de persistir en el medio ambiente pertenecen al grupo filogenético B1 siendo mas predominantes en los huéspedes no humanos y en muestras ambientales (Tenaillon *et al* 2010) Algunos autores han reportado que las cepas pertenecientes a los grupos B2 y D contienen mas factores de virulencia que las cepas de los grupos A y B1 (Johnson *et al* 1991) y son menos frecuentemente aisladas del medio ambiente (Gordon *et al* 2008)

Sin embargo este comportamiento pudiese ser debido a la utilización indiscriminada de antibioticos para fines de agricultura y ganaderia tal como lo describe Arias *et al* (2007) en su estudio Tasa de mutación en cepas de *E coli* aisladas de humanos aguas y cerdos y su relación con la patogenicidad y resistencia a los antibioticos indican que el uso de antibioticos en la agricultura promueve el desarrollo de resistencia a antibioticos en bacterias comensales del ser humano Además algunas drogas usadas terapéuticamente en animales pueden generar bacterias resistentes (Arias *et al* 2007)

Se ha sugerido que las condiciones climáticas geográficas factores de la dieta y/o el uso de antibioticos así como los factores genéticos del huésped influyen en la distribución de los grupos filogenéticos de *E coli* comensales de humanos (Duriez 2001) El gen *YjaA* (indicador del filogrupo B2) muestra alta prevalencia en la Ciudad del Niño al dar como resultado el 17.39% (8/46) y menor prevalencia en el Escobal con 6.25% (3/48) y en el Arado con 8.69% (4/46) Estos resultados son de suma importancia en vista que la población mayormente expuesta son niños por su vulnerabilidad en términos de inmunidad unido a que el organismo portador en cada uno de los puntos de muestra es de origen doméstico

Cabe resaltar también que en cuanto a datos generales del estudio hay un 15.71% (22/140) de las cepas estudiadas que pueden causar algún tipo de efecto adverso en

la salud de la población aunque es un porcentaje menor la posibilidad de contraerla es un problema latente en salud pública para el país

Se han encontrado bacterias resistentes a antibióticos en animales de granjas en animales asociados a productos alimenticios en ambientes contaminados por desechos de animales y en trabajadores de granja lo cual facilita la exposición de los humanos a nuevas cepas bacterianas comensales resistentes a antibióticos provenientes del ambiente o contaminación de agua comida o contacto con otros humanos (Smith *et al* 2001)

Arias y Jiménez (2007) en su estudio indican que a pesar que el grupo B2 es el más virulento y con más factores de virulencia contrario a lo que se esperaría no se puede relacionar directamente con una elevada tasa de mutación ni con una mayor resistencia a los antibióticos. Diversos estudios afirman que se han encontrado diferencias en la distribución de los grupos filogenéticos en la población. Los grupos A B1 y D predominan como flora normal mientras que el grupo B2 es menos prevalente (Duriez *et al* 2001) muy parecidos a los resultados obtenidos en este trabajo donde se evidencia un 83.57% de cepas comensales.

Estos datos también se relacionan con los encontrados por Escobar Parameo *et al* (2006) donde analizaron cepas aisladas de heces de aves animales mamíferos y seres humanos observando la prevalencia de los grupos D y B1 en aves A y B1 en animales mamíferos y A y B2 en los seres humanos concluyendo que uno de los principales factores que influyen en la estructura genética de las poblaciones de las *E. coli* entre los hospederos es la domesticación seguida por el clima. Baldy Chudzik *et al* (2008) analizaron las heces de animales de zoológico y encontraron una prevalencia del grupo B1 en los animales herbívoros y una prevalencia del grupo A en los animales carnívoros y omnívoros.

La prevalencia de los grupos A B1 y D puede deberse al aumento en la frecuencia de exposición a los antibióticos de las cepas comensales registrando cepas comensales

resistentes a antibióticos en humanos sugiriendo una posible transmisión subsecuente de animales a humanos (Johnson *et al* 2005)

Estudios han sugerido que mediante la transferencia horizontal las cepas del grupo filogenético B2 pueden aportar islas de patogenicidad o plásmidos con factores de virulencia a cepas de los grupos filogenéticos A y B1 convirtiendo a estas *E coli* no virulentas en patógenos tal como lo describe en su trabajo Moreno (2006) donde los aislados de *E coli* de los grupos filogenéticos no patógenos A y B1 pueden producir tanto infecciones del tracto urinario como otras infecciones extraintestinales en personas sanas pero principalmente en pacientes con factores favorecedores de infección. Estas *E coli* poseen por lo general una media de factores de virulencia significativamente menor que las *E coli* de los grupos B2 y D aunque algunas acumulan gran número de factores de virulencia probablemente adquiridos por transferencia horizontal lo que les hace semejantes a las *E coli* de los grupos patógenos B2 y D. Las *E coli* de los grupos filogenéticos A y B1 son significativamente más resistentes a las fluoroquinolonas que las de los grupos filogenéticos B2 y D e indican también que una vez que se genera la información genética las bacterias pueden transmitirse los nuevos genes a través de transferencia horizontal (entre individuos) por intercambio de plásmidos (Torres *et al* 2015)

Un ejemplo reciente de la evolución de una cepa virulenta está representado por la *E coli* O157 H7 la cual posee el fago stx el cual transporta los genes que codifican a la proteína Stx (Blanco *et al* 2004 Kaper *et al* 2004). La toxina Shiga ha llevado y está conduciendo la aparición de patógenos productores de la proteína Stx y desde la aparición de la *E coli* O157 H7 como causa de enfermedad humana significativa se han reportado más de 500 diferentes serogrupos de *E coli* que producen la proteína Stx (Kaper *et al* 2004)

Las cepas de *E coli* obtenidas en la comunidad del arado corresponden al 21.73% de cepas patógenas de las cuales 4.34% son de origen hídrico Sebaste *et al* (2008) analizaron aguas residuales de animales y humanos resultando que el filogrupo A era

el mas prevalente seguido del filogrupo B1 provenientes de las fuentes de aguas residuales de vaca cerdo y gallina Estos resultados concuerdan con los de este estudio ya que los filogrupos B2 y D son los menos frecuentes en el ambiente como lo describe Walk *et al* (2007) donde el filogrupo B1 tiene mayor capacidad de persistir en el ambiente y por tanto predominan mas en muestras ambientales y en huéspedes no humanos

El control de la calidad sanitaria de los recursos del ambiente puede llevarse a cabo mediante la enumeracion de bacterias indicadoras de contaminacion fecal Estas bacterias pueden ser utilizadas para valorar la calidad de los alimentos sedimentos y aguas destinadas al consumo humano la agricultura la industria y la recreacion No existe un indicador universal por lo que se debe seleccionar el mas apropiado para la situacion especifica en estudio (Larrea Murrell 2013)

A pesar de la utilidad de estos indicadores se conoce que cuando alguno de estos microorganismos se encuentran en altas concentraciones por ejemplo *E coli* su presencia tambien puede asociarse directamente al riesgo sanitario del empleo de las aguas (Fewtrell y Bartram 2001) La busqueda de los grupos patogenos o patotipos de *E coli* a partir de ecosistemas acuaticos contaminados se ha incrementado en los ultimos años y comienza a considerarse como un criterio mas para la evaluacion de la calidad microbiologica de las aguas (Sinclair *et al* 2012 Chen *et al* 2011 Bergholz *et al* 2011 Orsi *et al* 2007)

La investigaciones de Alvarez (2012) en la Habana relacionadas con los grupos patogenos de *E coli* especialmente los intestinales guardan una relacion cercana con este trabajo y confirma que los estudios de estos patogenos se han limitado a cepas de origen clinico y veterinario en particular de pacientes y algunos animales de interes economico con cuadros diarreicos (Lazo *et al* 2009 Aguila *et al* 2007 Blanco *et al* 2006) Sin embargo son pocas las publicaciones encontradas de trabajos dedicados a la busqueda de estos patotipos en ecosistemas dulceacuicolas a pesar que la implicacion clinica y epidemiologica se derivada de la presencia de estos grupos patogenos en las aguas

Entre las investigaciones que guardan relacion con nuestro tema en estudio podemos encontrar el estudio realizado por Alvarez (2012) sobre la evaluacion de la calidad microbiologica de las aguas de los rios Almendares Quibu y Luyano de la capital habanera y la ubicacion de fuentes contaminantes de origen domestico que contribuyen a la contaminacion de sus aguas Se caracterizaron ademas 113 cepas de *E coli* aisladas de estos tres ecosistemas dulceacuicolas mediante su serotipificacion determinacion de la presencia de genes de virulencia susceptibilidad antimicrobiana patrones de adherencia en cultivo de celulas HEp 2 y su diversidad genetica mediante la tecnica de Electroforesis en Campos Pulsantes

La *E coli* O157 H7 es considerada un patogeno emergente a nivel mundial y potencialmente fatal en infecciones humanas El ganado bovino es el reservorio primario de *E coli* O157 H7 por lo que el objetivo de esta investigacion fue dirigida a determinar la presencia de dicha bacteria en heces de ganado bovino de doble proposito del municipio Miranda estado Zulia Venezuela Se procesaron 309 muestras fecales de 155 vacas y 154 becerros provenientes de 6 fincas (Bravo *et al* 2007) En total se logro el aislamiento de seis cepas (1 94%) positivas a las pruebas de aglutinacion para antígeno somático O157 y flagelar H7 Adicionalmente se detecto una cepa O157 positiva no motil (O157 NM) No se observo diferencias significativas ($P>0.05$) en la excrecion de *E coli* O157 H7 al comparar los dos grupos de animales estudiados (Bravo *et al* 2007) Por estas razones las investigaciones de aislamiento y caracterizacion de aislados de *E coli* ambientales procedentes de ecosistemas acuaticos contaminados aportan informacion novedosa y necesaria para el conocimiento de esta tematica en nuestro pais y de la region

CONCLUSIONES

- 1 De las 140 muestras analizadas 25 se consideran cepas patógenas (Grupos B2 y D) y 115 cepas comensales (B1 y A)
- 2 El filogrupo B2 descrito como el filogrupo con mayor factor de virulencia se presentó con mayor prevalencia en La Ciudad del Niño con 17.39% (8/46) seguido por El Escobal con 6.25% (3/48) y el Arado con 8.69% (4/46)
- 3 El filogrupo B2 dentro de las cepas patógenas se presentó mayor prevalencia con un resultado de 11.43 (16/140) del total de las muestras analizadas
- 4 La comunidad de Ciudad del niño fue la que presentó mayor presencia de cepas de los filogrupos patógenos (B2 y D)
- 5 En relación al tipo de muestras la comunidad de El Arado presentó mayor prevalencia de cepas patógenas en cepas de origen humano y de vaca seguido de Ciudad del Niño con prevalencia en muestra de agua y gallina respectivamente
- 6 La comunidad de El Escobal en relaciones con las otras comunidades es la que presentó menor prevalencia de cepas ligadas a filogrupos patógenos
- 7 Los resultados obtenidos no muestran relación entre el tipo de muestra y la afinidad de los grupos filogenéticos indicando que los mismos se encuentran segregados en el ambiente de manera uniforme

RECOMENDACIONES

- 1 Es importante considerar para futuros estudios la diferencia entre cepas de origen humano de niños y de adultos ya que el efecto patogenico puede variar segun sea la edad del huesped
- 2 Estandarizar la PCR multiplex en tiempo real a nivel local para el analisis filogenetico de *E coli*
- 3 Considerar la evaluacion de estos factores ambientales en sectores vulnerables junto con el Ministerio de Salud MINSA y Salud Animal del Ministerio de Desarrollo Agropecuario MIDA de donde proceden un numero considerable de cuadros clinicos que tienen su origen en *E coli*
- 4 Ampliar el programa de monitoreo de aguas de consumo a nivel molecular e incentivar esta linea de investigacion ya que pasa a ser fundamento para estudios moleculares en el pais lo cual podria evitar problemas de salud publica si se detecta a tiempo
- 5 Incluir para estudios proximos el analisis de muestras de suelo para hacer una evaluacion integral de todos los factores ambientales que pudieran influir en la prevalencia de estas cepas patogenas
- 6 Realizar estudios comparativos entre temporadas seca y lluviosa para observar el comportamiento de estas cepas y su resistencia frente a factores ambientales adversos tomando en consideracion que pueden transferirse genes de resistencia por transferencia horizontal

BIBLIOGRAFÍA

- AMORÍN MB, SCHELOTTO F, CHIPARELLI H. 1999. Agentes de diarrea, gastroenteritis. *En: Temas de Bacteriología y Virología para CEFA*. Librería Médica Editorial. Pp. 303-322
- ABARCA G, HERRERA ML. 2001. Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Rev. Med Hosp Nac Niños*. 36:1-5.
- AESAN, 2012. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre medidas de prevención y recomendaciones aplicables para evitar posibles infecciones alimentarias por cepas de *Escherichia coli* verotoxigénicos/ productores de toxinas Shiga/ enterohemorrágicos (VTEC/ STEC/ EHEC). *Revista del Comité Científico*. 16:71-100.
- ÁGUILA A., BERNEDO R., LLOP A., RAMÍREZ M., BRAVO L., FERNÁNDEZ A., LEDO Y. 2007. Estudio de marcadores fenotípicos y de susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Escherichia coli* entéricas. *Rev. Cubana Med Trop*. 59 (2):102-107.
- ALONSO. M.Z. SANZ, M. E. PADOLA, P. M LLUCCHISI. 2014. Caracterización de Cepas de *Escherichia coli* Enteropatogénica, Aisladas Durante el Proceso de Faena de Pollos. *Rev. Argent Microbiol*. 46(2):122-125
- ÁLVAREZ J, SOTA, M, VIVANCO, A.B, PERALES I, CISTERNA, R, REMETERÍA, A, GARAIZAR, J. 2004. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. *J Clin Microbiol*. 42:1734-8.
- ÁLVAREZ ROMEU BEATRIZ. 2012. Caracterización de cepas de *Escherichia coli* de importancia clínica humana, Aisladas de Ecosistemas Dulceacuícolas de la

Habana Universidad de la Habana Facultad de Biología Tesis

ANDREU A 2005 Patogenia de las infecciones del tracto urinario SEIMC 23

(sup14) 15 21

ANDREWS S C A K ROBINSON AND RODRIGUEZ QUINONES F 2003 Bacterial

from homeostasis FEMS Microbiol Rev 27(2) 3 215 237

ANDERSSON DI HUGHES D 2010 Antibiotic resistance and its cost is it possible

to reverse resistance? Nat Rev Microbiol 8(4) 260 71

ARCOS M P S L AVILA DE NAVIA S M ESTUPIÑAN & A C GOMEZ 2005

Indicadores microbiologicos de contaminacion de las fuentes de agua Nova

3 69 79

ARIAS CHAVEZ A JIMENEZ TRUQUE N 2007 Tasa de mutacion en cepas de

Escherichia coli aisladas a partir de humanos agua cerdo y su relacion con la
patogenicidad y resistencia a los antibioticos Tesis

AVISE J C 1994 Molecular markers natural history and evolution Chapman and

Hall New York

AVISE J C 2000 Phylogeography the history and formation of species Harvard

University Press Cambridge MA

BATISTA G Y YEE 2010 Patrones de resistencia Antimicrobiano en Cepas de

Escherichia coli procedentes de muestras fecales y de aguas Tesis de

licenciatura Universidad de Panama Panama Pp 51

BINGEN E DENAMUR E Y ELION J 1994 Use of ribotyping in epidemiological

surveillance of nosocomial outbreaks Clin Microbiol Rev 7(3) 311 327

- BALDY-CHUDZIK K, MACKIEWICZ P & STOSIK M. 2008. Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo. *Vet Microbiol.* 131(1):173-184.
- BARNES H, NOLAN L. VAILLANCOURT JP. 2008. Colibacillosis. In: Saif Y, editor. *Diseases of poultry*. 12th ed. Iowa: Blackwell Publishing. Pp. 691–732.
- BARRETO A, GUILLERMO; SANCHEN C, ALEXIS Y HERNÁNDEZ C, RAQUEL I. 2006. Diagnóstico de *Escherichia coli* enterohemorrágica en niños con diarreas. *SciELO10*(3):81-91 .
- BERNNETT P.M. 2004. Planificación de genoma, inserción y secuencia de elementos transposones e integrones. *Mét Biol Mol.* 266:71-113.
- BERGHOLZ P.W., NOAR J., BUCKLEY D.H. 2011. Environmental patterns are imposed on the population structure of *Escherichia coli* after fecal deposition. *Appl Environ Microbiol.* 77(1):211-219.
- BERNARD R. G AND PASTERNAK J. J. 1998. *Molecular Biotechnology. Principles Applications of Recombinant DNA*. 2ª ed, Estados Unidos, Washington, DC: ASM Press. Pp. 683.
- BETANCOR L, GADEA MP, FLORES K. 2008. *Genética Bacteriana*. En: Instituto de Higiene, Facultad de Medicina (UDELAR). *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. 3ra Ed. Montevideo: Oficina del Libro FEFMUR; 2008. p. 65-90.
- BEUTIN, L., GEIER, D., STEINRUCK, H., ZIMMERMANN, S., SCHEUTZ, F., 1993 "Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like-toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals". *J Clin Microbiol.* (43:2483-2488
- BEUTIN, L., KONG, Q., FENG, L., WANG, Q., KRAUSE, G., LEOMIL, L., JIN, Q., WANG, L., 2005. "Development of PCR assays targeting the genes involved in synthesis and assembly of the new *Escherichia coli* O174 and O177 O antigens". *J Clin Microbiol.* 43:5143-5149.

- BEUTIN L 1999 *E. coli* as a pathogen in dogs and cats *Vet Res* 30(2-3) 285
- BLANCO M LAZO L BLANCO J E DAHBIG MORA A LOPEZ C GONZALEZ E A
BLANCO J 2006 Serotypes virulence genes and PFGE patterns of
enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from Cuba pigs with diarrhea
Intern Microbiol 9(5) 53-60
- BLANCO J ALONSO M P BLANCO M GONZALEZ E A 1991 Mecanismo de
patogenesis de los *Escherichia coli* causantes de infecciones extraintestinales
Enferm Infecc Microbiol Clin 6 163-176
- BLANCO J BLANCO M BLANCO J E MORA A ALONSO M P GONZALEZ E A
AND BERNARDEZ M I 2002 Enterobacterias características generales
Genero *Escherichia* *Manual de Microbiología Veterinaria* capítulo 21 Pp
301-325
- BLANCO M BLANCO J E MORA A BLANCO J 1996 *Escherichia coli*
septicémicos aviares serotipos factores de virulencia resistencia a
antibióticos y desarrollo de vacunas Departamento de Microbiología y
Parasitología Facultad de Veterinaria Universidad de Santiago de Compostela
(LUGO) *Med Vet* 13(10) (525-537)
- BLANCO M BLANCO J BLANCO J E RAMOS J 1993 Enterotoxigenic
verotoxigenic and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in
Spain *Am J Vet Res* 54(9) 1446-5
- BLATTER J A 1997 The complete genome sequence of *Escherichia coli* K 12
Science 277 1453-1462
- BRECHTBUEHL K S A WHALLEY G M DUSHEIKO N A SAUNDERS Rapid time
quantitative Polymerase Chain Reaction for hepatitis B virus *J Biol
Methods (JBM)* 93 105-113
- CALDERON J 2013 Diagnostico y tratamiento de las infecciones en vías urinarias
un enfoque multidisciplinario para casos no complicados *Bol Med Hosp*
70(1) 3-10
- CARDOZO A M BERNAL L F ROMAN R A PIÑALES P CARRASCAL A K CAMACHO
D C ZAMBRANO 2013 Electroforesis en Gel de Campo Pulsado

- (PFGE) para la diferenciación Molecular de *Listeria monocytogenes* Univ Sci 18(2) 203 222
- CHAMBERLAIN JS GIBBS RA RANIER JE NGUYEN PN CASKEY CT 1998 Deletion screening of the duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification Nucleic Acids Res 16 11147 56
- CHEN B ZHENG W YU Y HUANG W ZHENG S ZHANG Y GUAN Y ZHUANG Y CHEN Y TOPP E 2007 Class 1 Integrons selected virulence genes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates from the Minjiang river Fujian province China Appl Environ Microbiol 77(1) 148 155
- CLERMONT O BONACORSI S BINGEN E 2000 Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group Appl Environ Microbiol 66 4555 4558
- COHEN S P L M MCMURRY Y S B LEVY 1988 marA locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple antibiotic resistant(Mar) mutants of *Escherichia coli* J Bacteriol 170 5416 5422
- CORTES M C 2007 El ganado caprino como reservorio de bacterias enteropatógenas potencialmente zoonóticas Tesis Doctoral Facultad de Veterinaria UCM
- CORTEZ O I A 2002 Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco México Salud Pública 44(4) 297 302 [citado 2015 02 24]
- COSTA J 2004 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a tiempo real Barcelona España Enferm Infecc Microbiol Clin 22(5) 299 305
- CRESPO P S PORTERO R C USERA M A ONTAÑÓN S V 1998 Especificidad de los sistemas de vigilancia de la salud pública diagnóstico de *E. coli* verotoxigenico en España Bol Epidemiol Sem 6(4) 37 48
- DI CONZA JA GUTKIND GO 2010 Integrons gene collectors Rev Argent Microbiol 42 63 78
- DOZOIS C M DHO MOULIN M BREE A FAIRBROTHER J M DESAUTELS C AND CURTIS R 2000 Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the tsh genetic region IAI 4145 4154

- DUARTE GOMEZ O 2014 Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* enteropatogenas en Colombia Rev Chilena Infectol 31(5) 577 586
- DURIEZ P CLERMONT O BONACORSI S BINGEN E CHAVENTRE A ELION J PICARD B DENAMUR E 2001 Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations Microbiol 147 1671–1676
- DZIVA F STEVENS M P 2008 Colibacillosis in poultry unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts Avian Pathol 37(4) 355 66
- ECHEVERRIA Z SARMIENTO J AGUILAR E Y OSORES P 2006 Infeccion del tracto urinario y manejo antibiotico Acta Med Per 23(1)
- ELNIFRO E M ASHSHI A M COOPER R J KLAPPER P E 2000 Multiplex PCR optimization and application in diagnostic virology Clin Microbial Rev 13 559 70
- ESCOBAR PARAMO P LE MENAC H A LE GALL T AMORIN C GOURIOU S PICARD B SKURNIK D DENAMUR E 2006 Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates Environ Microbiol 8 1975 1984
- ESLAVA C MATEO J CRAVIOTO A 1994 Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea En diagnostico de laboratorio de infecciones gastrointestinales Giono S Escobar A Valdespino JL Secretaria de Salud Mexico Pp 251
- FERNANDEZ AL VARELA E MARTINEZ L MARTINEZ A SIERRA J GONZALEZ JUANATEY J REGUEIRO B 2010 Evaluacion de una PCR multiplex en tiempo real para la deteccion de patogenos en el tejido valvular de pacientes con endocarditis Rev Esp Cardio 63(10) 1205 8
- FERNANDEZ DANIEL Y PADOLA NORA L 2012 *Escherichia coli* verocitotoxigenico varias cuestiones y los tambos tambien Rev Argent Microbiol 44(4) 312 323
- FEWTRELL L Y BARTRAM J 2001 Water quality Guidelines Standards and

Health World Health Organization Water Series IWA Publishing London
(UK)

- GALLEGOS ROBLES M A LAREDO A M OJEDA A G SOSA E S VAZQUEZ C V
CASTILLO O 2009 Deteccion de *Salmonella spp* en melon mediante reaccion
en cadena de la polimerasa (PCR) Agricultura Organica 2a Edicion ISBN
978 607 00 1646 7
- GARRITY G BRENNER D J KRIEG N R STALEY J T 2005 Bergey s manual of
determinative bacteriology Springer New York EE UU
- GENETICA BACTERIANA 2008 Instituto de Higiene Facultad de Medicina (UDELAR)
Temas de Bacteriologia y Virologia Medica 3ra Ed Montevideo Oficina del
Libro FEFMUR 65 90
- GOMEZ D MILIWEBSKY E SILVA A DEZA N ZOTTA C COTELLA O
MARTINEZ ESPINOSA E CHINEN I FERNANDEZ PASCUA C RIVAS M
2005 Aislamiento de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga durante un
brote de gastroenteritis en un Jardin Maternal de la Ciudad de Mar del Plata
Rev Argent Microbiol 37(4) 176 183
- GORDON DM CLERMONT O TOLLEY H & DENAMUR E 2008 Assigning
Escherichia coli strains to phylogenetic groups multi locus sequence typing
versus the PCR triplex method Envir Microbiol 10(10) 2484 2496
- HANNAOUI RODRIGUEZ E J & VILLALOBOS L B (2009) *Escherichia coli*
shigatoxigenica Patogenesis diagnostico y tratamiento Rev Soc Venez
Microbiol 29(1) 13 20
- HARVEY P & H STERRS 1999 One use of phylogenies for conservation biologists
inferring population history from gene sequences In LANDWEBER L F & A P
DOBSON (eds) Genetics and the extinction of species DNA and the
conservation of biodiversity Princeton University Press Princeton New
Jersey Pp 101 120
- HERNANDEZ B O DEBESA PADILLA A QUESADA L 2009 Purificacion de ADN
genomico humano para el diagnostico del lupus eritematoso
sistemico AMC [online] 13(1) 0 0

- HERNANDEZ CORTEZ C AGUILERA ARREOLA MG CASTRO ESCARPULLI G 2011
Situacion de las enfermedades gastrointestinales en Mexico *Enf Inf Microbiol*
31(4) 137 151
- HERNANDEZ CORTEZ A A CASTRO E G 2011 Situacion de enfermedades
gastrointestinales en Mexico *Enf Infec Microbiol* 31(4) 137 151
- HERNANDEZ LEON R I VELAZQUEZ M C OROZCO MOSQUEDA G 2010
Metagenomica de suelo Grandes desafios y nuevas oportunidades
biotecnologicas *Phyton (B Aires)* 79(2) 133 139
- HERZER P J INOUE S INOUE M WHITTAM T S 1990 Phylogenetic
distribution of branched RNA linked multicopy single stranded DNA among
natural isolates of *Escherichia coli* *J Bacteriol* 172 6175 6181
- JOHNSON JR KUSKOWSKI MA GAJEWSKI A SOTO S HORCAJADA JP JIMENEZ DE
ANTA MT ET AL 2005 Extended virulence genotypes and phylogenetic
background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis
pyelonephritis or prostatitis *J Infect Dis* 191 46 50
- JOHNSON JR DELAVARI P KUSKOWSKI M & STELL AL 2001 Phylogenetic
distribution of extraintestinal virulence associated traits in *Escherichia coli* *J*
Infect Dis 183(1) 78 88
- KAPER J B NATARO J P MOBLEY H L 2004 Pathogenic *Escherichia coli* *Nat Rev*
Microbiol 2(2) 123 140
- LAZO L DAHBI G BLANCO M BLANCO J E BLANCO J LLORENS F 2009
Aplicacion de tecnicas moleculares en la caracterizacion de aislados de
Escherichia coli procedentes de cerdos con sindrome diarreico en la provincia
de Villa Clara *Rev Salud Anim* 31(2) 93 104
- LECOINTRE G RACHDI L DARLU P & DENAMUR E 1998 *Escherichia coli*
molecular phylogeny using the incongruence length difference test *Mol Biol*
Evol 15(12) 1685 1695
- LEE S H JOUNG M YOON S CHOI K PARK W Y YU J R 2010 Multiplex PCR
detection of waterborne intestinal protozoa *Microsporidia Cyclospora* and
Cryptosporidium *Korean J Parasitol* 48 297 301

- LEVINE M M 1987 *Escherichia coli* that cause diarrhea enterotoxigenic enteropathogenic enteroinvasive enterohemorrhagic and enteroadherent J Infect Dis 155 377 389
- LOPEZ W CHAMORRO M GARMENDIA A 2011 Detección rápida de rotavirus y Coronavirus en crías de Alpaca con diarrea en la región del Cusco Perú Rev Vet 22(4) 407 411
- MALTTAR SALIM 2005 Utilidad de la Biología molecular en el estudio de zoonosis Universidad de Córdoba Instituto de Biología del Trópico mvz Córdoba 5 (1) 46 50
- MARCHETTI M L ERRECALDE J MESTORINO N Resistencia Bacteriana a los Antibióticos ocasionados por la bomba de flujo impacto en la multiresistencia Rev Analecta Vet 31(2) 40 53
- MARGALL N DOMINGUEZ A PRATS G SALLERAS L 1997 Gastro hemorrágico *Escherichia coli* Rev Esp Salud Pub 71 437 43
- MARTINEZ C DIAZ J A CAMBRONEROS Y J L SENOVILLA PEREZ 1997 Fisiopatología de la infección urinaria Clin UrolCamputense 5 55 64
- MARTINEZ CORTAZAR A RINCON SILVA E 2004 Método Físico Químico en Biotecnología Universidad Autónoma de México Tesis
- MILLAN Y HERNANDEZ E MILLAN B & ARAQUE M 2014 Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena productora de β lactamasa CTX M 15 aisladas de pacientes de la comunidad en Mérida Venezuela Rev Arg de Microbiol 46(3) 175 181
- MIRANDA G M^a C 2013 *Escherichia coli* portador de betalactamasas de espectro extendido resistencia Sanid Mil 69(4) 244 248
- MORENO E PRATS G PLANELLAS I PLANES AM PEREZ T ANDREU A 2006 Caracterización de *Escherichia coli* de los grupos filogenéticos A y B1 causantes de infección extraintestinal Enferm Infecc Microbiol Clin 24 483
- MORITZ C 1995 Uses of molecular phylogenies for conservation Phil Trans Rev

- MOSQUITO S RUIZ J BAUER JL OCHOA TJ 2011 Mecanismos moleculares de resistencia antibiotica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea RPMESP 28(4) 648 56
- MULLIS K Y B FALOONA 1987 Specific synthesis of AND in vitro via Polymerase Chain Reaction Meth Enzymol 155 335 350
- MUNIESA 2011 Trasferencia genetica horizontal en *Escherichia coli* patogenas Dep Microbiologia Universidad de Barcelona Diciembre Pp 52 24
- NARVAEZ R VALENZUELA C B MUÑOZ J HINRICHSSEN R 2000 Comparacion de RAPD y AFLP como metodo de identificacion genetica basado en el estudio de fragmentos Genomicos Cuba 60(4) 320 340
- NARVAEZ BRAVO C A G CARRUYO NUÑEZ M MORENO A RODASGONZALEZ E HOET AND T E WITTUM 2007 Aislamiento de *Escherichia coli* O157 H7 en muestras de heces de ganado bovino doble proposito del municipio de Miranda Estado Zulia Venezuela Rev Cientifica (Maracaibo) 17 239-245
- NATARO J P KAPER J B 1998 Diarrheagenic *Escherichia coli* Clin Microbiol Rev 11 142 201
- NOWROUZIAN FL WOLD AE & ADLERBERTH I 2005 *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants J Inf Dis 191(7) 1078 1083
- OCAÑA GARRIDO ELENA 2005 Caracterizacion de los sistemas de captacion de hierro y zinc del patogeno animal *Pasteurella multocida* Universidad Autonoma de Barcelona Tesis
- OCHOA THERESA J ET AL 2011 Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarrogenicas en niños peruanos con y sin diarrea Rev peru med exp salud publica vol 28 n 1 pp 13 20
- OLAECHEA P M INSAUSTI J BLANCO A & LUQUE P 2010 Epidemiologia e

- impacto de las infecciones nosocomiales *Med Intensiva* 34(4) 256 267
- OMS 2002 Informe sobre la salud en el mundo Reducir los riesgos y promover una vida sana OMS Ginebra
- ORSI R H STOPPE N C SATO M I Z GOMES T A T PRADO P I MANFIO G P
- OTTOBONI L M M 2007 Genetic variability and pathogenicity potencial of *Escherichia coli* isolated from recreational water resevoirs *Res Microbiol* 158 (14) 420 427
- OSATINSKY R 2007 ¿Que es la electrophoresis capilar? *Bioquímica y Patología Clínica Redalyc* 71(2) 60 66
- OSCAR G GOMEZ DUARTE 2014 Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* enteropatogenas en Colombia *Rev Chilena Infectol* 31(5) 577 586
- PRADO J V CAVAGNARO S M 2008 Síndrome hemolítico uremico asociado a infección intestinal por *Escherichia coli* productora de shigatoxina (STEC) en pacientes chilenos aspectos clínicos y epidemiológicos *Rev chil infectol* Santiago v 25 n 6 dic
- PALOMINO CAMARGO C GONZALEZ MUÑOZ Y 2014 Molecular techniques for detection and identification of pathogens in food advantages and limitations *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 31(3) 535 46
- PEREZ DE ROSAS A M 2003 Estudio de la diversidad Intestinal por RFLP En *Avances en nutrición y alimentación animal* Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal Pp 31 45
- PERNA N T 2001 Genome sequence of enterohaemorrhagic *E coli* O157 H7 *Nature* 409 529 533
- PICARD B SEVALI GARCIA J GOURIOU S DURIEZ P BRAHIMI N BINGEN E DENAMOUR E 1998 The link between Phylogeny and Virulence in *Escherichia coli* Extraintestinal Infection *Infect Immun* 67(2) 546 553
- PIGRAU C 2011 Horcajada JC Carton JA Pujol M Infección de la vía urinaria inferior *Soc Esp Enf Infec*
- POSSO D D 2009 Protocolo de electroforesis del ADN en geles de agarosa *Protocolos de laboratorio* Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas

- Altos de Pipe Venezuela RIVERO M A PADOLA N L ETCHEVERRIA A I
PARNA A E 2004 *Escherichia coli* entero hemorrágica y síndrome uremico hemolítico en Argentina Medicina (B Aires) 64(4) 352 356
- RODRIGUEZ A G 2002 Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli* Salud pública 44(5) 464 475
- RODRIGUEZ ANGELES GUADALUPE (2002) Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli* Salud Publ Mex 44(5) 464 475
- RUIZ A V MORENO S G 2005 Tratado de SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Buenos Aires Medical Panamericana Pp 76
- STEHLENGER EG YANO T BROCCHI M DA SILVEIRA WD 2003 Characterization of a plasmid encoded adhesin of an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain isolated from a case of swollen head syndrome (SHS) Vet Microbiol 95(1 2) 111 20
- SOUSA V 2001 ECOLOGIA EVOLUTIVA DE *ESCHERICHIA COLI* REV SCIELO 26(10) 513 517
- SINCLAIR R G ROSE J B HASHSHAM S A GERBA C P HAAS C N 2012 Criteria for Selection of Surrogates Used To Study the Fate and Control of Pathogens in the Environment Appl Environ Microbiol 78(6) 1969 1977
- SABATE M PRATS G MORENO E BALLESTE E BLANCH AR & ANDREU A 2008 Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater Res Microbiol 159(4) 288 293
- SAMBROOK J AND D RUSSELL 2001 Molecular Cloning A Laboratory Manual 3rd edition Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor NY Pp 5 8 5 76
- SAMBROOK J FRITSCH E F AND MANIATIS T (1989) Gel electrophoresis of DNA In Sambrook J Fritsch E F and Maniatis T (Eds) Molecular Cloning a Laboratory Manual New York Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor NY USA chapter 6

- SCHWARTZ D C CANTOR C R 1984) Separation of yeast chromosome sized DNAs by pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis *Cell* 37(1) 67 75
- SELANDER R K CAUGANT D A OCHMAN H MUSSER J M GILMOUR M N WHITTAM T S 1986 Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics *Appl Environ Microbiol* 51 873 884
- SERRATO DIAZ A FLORES L RENTERIA J CORTEZ J A PALACIO S E 2014 Herramientas moleculares aplicadas en ecologia Aspectos teoricos y practicos Mexico D F
- SHEMIS M A EL ABD D M RAMADAN D I EL SAYED M I GUIRGIS B S SABER M A AZZAZY H M 2012 Evaluation of multiplex nested polymerase chain reaction for routine hepatitis C virus genotyping in egyptian patients *Hepat Mon* 12 265 70
- SHU LIUL HESSEL A SANDERSON K E 1993 Genomic Mapping with I Ceu I an intran encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA in Salmonella spp Escherichia coli and other bacteria *Proc Nat Acad Sci* 90 6874 6878
- SILVA R L ALVARADO G O Y MARTINEZ S J P 1999 La reaccion en cadena de la polimerasa como herramienta de diagnostico en virologia vegetal *Fitopatologia* 34(1) 13 21
- SOTO S 2006 Expresion de factores de virulencia en cepas extra intestinales de *Escherichia coli* *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24 479 480
- SOUTHERN E M ANNAND R BROWN W R A FLETCHER D S 1987 A model for the separation of large DNA molecular by crossed field gel electrophoresis *Nucleic Acids Res* 15 592 5943
- SUNDE M SORUM H 2001 Self transmissible multidrug resistance plasmids in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of healthy swine *Microb Drug Resist* 7 191 196
- TENAILLON O SKURNIK D PICARD B & DENAMUR E 2010 The population genetics of commensal *Escherichia coli* *Nat Rev Microbiol* 8(3) 207 217
- THAPAR N SANDERSON IR 2004 Diarrhoea in children an interface between

- developing and developed countries Lancet 363(9409) 641–653
- TODAR K 2008 Pathogenic E coli University of Winconsin Madison Department of Bacteriology
- VALDEVENITO S J P 2008 Infeccion urinaria recurrente en la mujer Rev Chil Infectol [online] [citado 2015 01 28] 25(4) 268 276
- VIDAL J 2003 Escherichia coli enteropatogena (EPEC) Una causa frecuente de diarrea infantil Salud en Tabasco 9(1) 188–193
- VILA J ALVAREZ MARTINEZ MJ BUESA J CASTILLO J 2009 Diagnostico microbiologico de las infecciones gastrointestinales Enferm Infecc Microbiol Clin 27 406 411
- VILLA MELISSA BERAUN VALDEZ M L 2013 Diarrea del viajero Rev Med 24 543
- VILLALOBOS G L G 2012 Incidencia de grupos patogenos de *Escherichia coli* en caso de gastroenteritis en el estado de Jalisco durante los años 2005 2007 Universidad de Guadalajara Division de ciencias biologicas ambientales
- WALK ST ALM EW CALHOUN LM MLADONICKY JM & WHITTAM TS 2007 Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches Environ Microbiol 9(9) 2274 2288
- WONG M L MEDRANO J F 2005 Real time PCR for mRNA quantitation Bio Techniques 39 75 85
- RODRIGUEZ BAÑO J NAVARRO M D ROMERO L MUNIAIN M A PEREA E J PEREZ CANO 2006 Clinical and molecular epidemiology of extended spectrubeta lactamase producing *Escherichia coli* a cause of nosocomial infection or colonization implications for control Clin Infect Dis 1 42(1) 37 45
- SUNDE M 2005 Prevalencia y caracterizacion de Clase 1 y clase 2 de integrones en *Escherichia coli* JAC 56 10190 1024
- LARREA MURRELL J A ET AL 2013 Bacterias indicadoras de contaminacion fecal en la evaluacion de la calidad de las aguas revision de la literatura 44(3) pp 24–34